

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**METABOLISMUS MONEPANTELU U PARAZITŮ  
A JEJICH HOSTITELŮ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Martin Valát

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Martin Valát

Děkuji vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D., Mgr. Lucii Stuchlíkové a prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc. za metodické vedení, cenné rady a pomoc při experimentální práci. Rovněž děkuji za možnost vypracovat diplomovou práci v rámci projektu financovaného Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (číslo projektu 673612/B-CH/2012) a Grantovou agenturou České republiky (číslo projektu P502/10/0217).

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Martin Valát

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Metabolismus monepantelu u parazitů a jejich hostitelů

Monepantel (MOP) patří do nové skupiny anthelmintických léčiv - aminoacetonitrilových derivátů. Od běžně používaných širokospektrých léčiv (makrocyclické laktony, benzimidazoly a imidazothiazoly) se liší chemickou strukturou a mechanismem účinku. Z důvodu velmi častého používání léčiv z těchto skupin se u mnoha patogenních parazitů vyvinula rezistence. MOP je účinný i proti parazitům rezistentním na výše zmíněné skupiny. Cílem této studie byla identifikace a porovnání metabolitů první a druhé fáze biotransformace MOP u parazitů (*Haemonchus contortus* - citlivý kmen ISE a multirezistentní kmen WR) a u jejich hostitelů - ovce (*Ovis aries*) prostřednictvím *in vivo* a *ex vivo* studie. Pro identifikaci metabolitů byla použita ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC/MS). U ovce v *in vivo* studii bylo detekováno 13 metabolitů MOP první a druhé fáze biotransformace, 7 z nich nebylo dosud popsáno. U parazita v *ex vivo* studii byly stanoveny pouze 4 metabolity první fáze biotransformace. Byly zjištěny tyto biotransformační reakce MOP: S-oxidace, hydroxylace, hydrolyza nitrilové skupiny na amidovou skupinu, glukuronidace a konjugace s glutathionem, který byl následně přeměněn na konjugát s acetylcysteinem. Na základě stanovených metabolitů bylo navrženo schéma metabolické dráhy MOP u parazita a jeho hostitele.

# ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Martin Valát

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Metabolism of monepantel in parasites and their hosts

Monepantel (MOP) belongs to a new class of anthelmintic drugs - amino-acetonitrile derivatives. They differ from the commonly used broad-spectrum drugs (makrocyclic lactones, benzimidazoles and imidazothiazoles) in chemical structure and mechanism of action. Because of frequent use of these classes the resistance in many pathogenic parasites was developed. The aim of this study was identification and comparison of phase I and II metabolites of MOP biotransformation in parasites (*Haemonchus contortus* – sensitive strain ISE and multi-resistant strain WR) and in their hosts - sheep (*Ovis aries*) through *in vivo* and *ex vivo* study. Ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry technique (UHPLC-MS/MS) was used for identification of MOP metabolites. In sheep, 13 metabolites of phase I and II biotransformation of MOP were detected in *in vivo* study, 7 of them have not been described previously. In parasites *ex vivo*, only 4 metabolites of phase I MOP biotransformation were found. Following biotransformation reactions of MOP were detected: S-oxidation, hydroxylation, hydrolysis of nitril to amide, glucuronidation and conjugation with glutathione which was subsequently transformed to conjugate with acetylcysteine. Based on the obtained results, scheme of metabolism of the metabolic pathways of MOP in parasites and in their hosts have been proposed.

# OBSAH

1 Úvod.....	8
TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2 <i>Haemonchus contortus</i> .....	9
2.1 Morfologie.....	9
2.2 Vývojový cyklus .....	11
2.3 Patogeneze, klinické projevy a diagnostika .....	12
3 Terapie helmintóz .....	14
3.1 Farmakoterapie a farmakoprolaxe .....	14
3.1.1 Makrocyclické laktony .....	14
3.1.2 Benzimidazoly .....	15
3.1.3 Imidazothiazoly .....	16
3.1.4 Amino-acetonitrilové deriváty .....	16
3.2 Jiné možnosti léčby.....	17
3.2.1 Řízení pastvy.....	18
3.2.2 Biologická kontrola.....	18
3.2.3. Obohacení stravy .....	19
3.2.4 Vakcinace.....	19
4 Rezistence .....	21
5 Metabolismus xenobiotik.....	23
5.1 První fáze biotransformace .....	23
5.2 Druhá fáze biotransformace.....	25
6 Metody stanovení metabolitů xenobiotik .....	29
6.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	29
6.2 Hmotnostní spektrometrie.....	30
6.2.1 Ionizační techniky.....	31
6.2.2 Analyzátory.....	32
7 Cíle práce .....	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
8 Biologický materiál, přístrojové vybavení, reagentie a chemikálie .....	34
8.1 Biologický materiál.....	34
8.2 Přístrojové vybavení.....	34

8.3 Reagencie a chemikálie.....	35
9 Pracovní postupy.....	38
9.1 Příprava MOP.....	38
9.2 Příprava pracovních roztoků .....	38
9.3 Sběr biologického materiálu .....	39
9.3.1 Sběr parazitologického materiálu .....	39
9.3.2 Sběr exkrementů .....	40
9.4 Kultivace nematod a biotransformace MOP <i>ex vivo</i> .....	41
9.5 Příprava vzorků a extrakce na pevných fázích.....	42
9.6 Podmínky měření .....	42
10 Výsledky .....	44
10.1 Metabolity první fáze biotransformace MOP .....	46
10.1.1 Studie u ovce <i>in vivo</i> .....	46
10.1.2 Studie u <i>H. contortus ex vivo</i> .....	48
10.2 Metabolity druhé fáze biotransformace MOP .....	48
10.2.1 Studie u ovce <i>in vivo</i> .....	48
10.2.2 Studie u <i>H. contortus ex vivo</i> .....	49
11 Diskuze .....	53
12 Závěr .....	58
13 Seznam zkratk .....	59
14 Seznam použité literatury .....	62

# 1 ÚVOD

Infekční onemocnění způsobené helminty je významným problémem nejen veterinární, ale i humánní medicíny. Pro léčbu helmintóz se zpravidla používají širokospektrá anthelmintika ze skupin benzimidazolů, makrocyclických laktonů a imidazothiazolů. Na tyto přípravky se stále častěji objevují případy rezistence a vznikají nové multirezistentní kmeny helmintů (Taylor *et al.* 2002).

Možností, jak předejít epidemii helmintóz rezistentních na farmakoterapii, může být například objev nových sloučenin s anthelmintickou aktivitou a rozdílnou chemickou strukturou než předchozí skupiny. Ovšem tyto látky musí vykazovat nízkou toxicitu a dobrou snášenlivost.

Jedním z poměrně nedávno objevených anthelmintik je monepantel (MOP), který spadá do skupiny amino-acetonitrilových derivátů (AAD). Jeho zcela odlišná struktura a mechanismus účinku v porovnání s ostatními širokospektrými anthelmintiky zajistily vysokou účinnost i proti kmenům rezistentním na benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony a kombinaci derquantelu a abamektinu (Bustamante *et al.* 2009, Hosking *et al.* 2010, Kaminsky *et al.* 2009, Kaminsky *et al.* 2011, Sager *et al.* 2009).

Znalost metabolických drah léčiva je nezbytná pro bezpečnou a účinnou terapii a může dále pomoci určit i potenciální riziko lékových interakcí. Zjištění biotransformačních přeměn, kterými dochází k deaktivaci léčiv u parazita, je možností, jak odhalit probíhající proces vzniku rezistence.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 2 HAEMONCHUS CONTORTUS

*Haemonchus contortus* (*H. contortus*), v České republice známý i pod názvem vlasovka slezová, je původcem častého onemocnění přežvýkavců zvaného haemonchóza. Mezi nejběžnější hostitele patří hovězí dobytek, ovce, kozy a další volně se pasoucí přežvýkavci. Tato patogenní nematoda parazitují ve slezu hostitelů, kde narušují jeho stěnu za účelem přístupu ke krvi, kterou se živí (Jurášek a Dubinský 1993).

### 2.1 Morfologie

Nematoda *H. contortus* mají nitkovitý tvar těla hnědočervené barvy, přičemž samci dosahují délky 10 – 20 mm a samice 18 – 30 mm. Povrch těla je pokryt kutikulou, která je tvořena z hlouběji uložené hypodermisy. Pod hypodermou jsou uloženy svalové buňky, které jsou uspořádány do pásů oddělených hypodermálními lištami a ohraničují primární tělní dutinu. Tělní dutina je vyplněna tekutinou, jejíž vysoký tlak napomáhá k zajištění turgoru tělní stěny, čímž udržuje i tvar těla. Pomocí kontrakce dorzálních a ventrálních svalů je umožněn pohyb parazita. Ostatní nitkovité orgány jsou uloženy v tělní dutině. Kutikula je rozdělena prstencovitými zářezy připomínající článkování. Kutikula vytváří rudimentální ústní kapslu a kyjovitý zub, pomocí kterého získávají potravu. Na předním a zadním konci těla jsou umístěny papily, které mají podpůrnou a senzoryckou funkci. Rozšířená část kutikuly podél těla se označuje jako křídla (Jurášek a Dubinský 1993, Sedlák 2005).

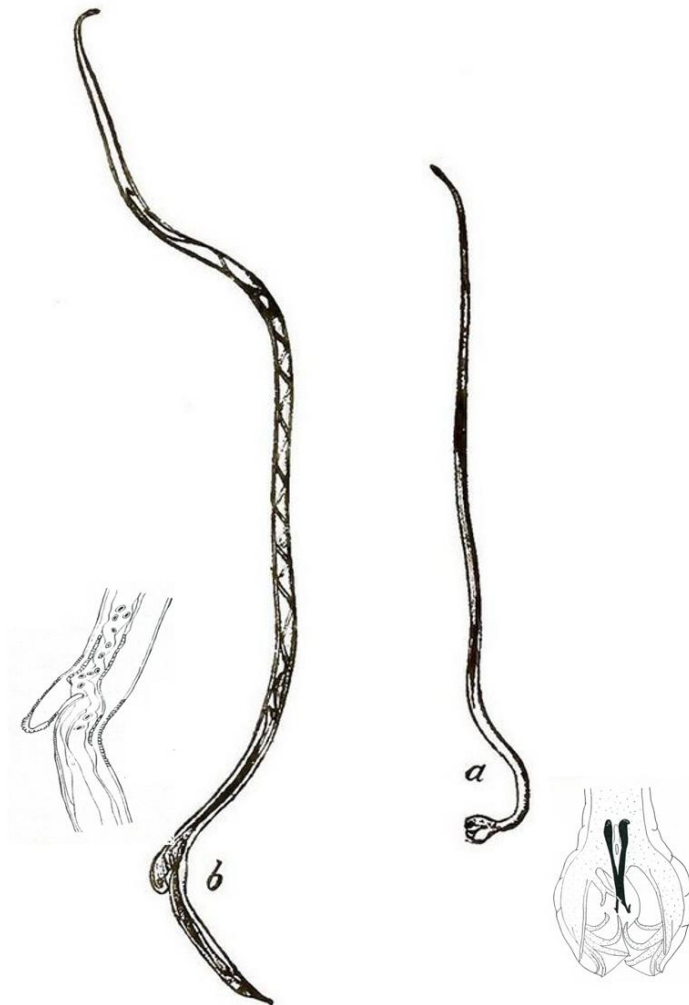
Nervová soustava se skládá z gangliových buněk, které vytvářejí nervový prsteneček kolem jícnu, ze kterého vybíhají nervové provazce. Jsou navzájem propojené a umístěné převážně v hypodermálních lištách. Plazmatické výběžky podélné svaloviny jsou přímo napojené na dva hlavní provazce uložené v hřbetní a břišní liště, které zajišťují inervaci svaloviny. Řitní otvor a pohlavní orgány inervují ganglia uložená na zádi. Váčekové chemoreceptory uložené v přední (amfidy) a v zadní (fazmidy) části těla slouží společně s mechanoreceptory (papily) jako smyslové orgány (Sedlák 2005).

Trávicí soustava je úplná a trubicovitá. Mají ústní kapslu s jedním kyjovitým zubem, který slouží k získávání potravy. Jícen je svalnatý, savý, cylindrický, bez zúžení, se žláznatou zadní částí. Dále přechází ve střevo, které je zakončeno análním otvorem. U samců vyúsťuje společně s pohlavními orgány do kloaky (Gunn a Pitt 2012, Jurášek a Dubinský 1993, Sedlák 2005).

Vylučovací soustava se skládá z protonefridiálních chodeb uložených v postranních hypodermálních lištách. V přední části se tyto chodby spojují a vyúsťují společným exkrecním otvorem v oblasti jícnu. K vylučování odpadních látek mohou sloužit i velké párovité žláznaté buňky, které vytvářejí kožní žlázy a vyúsťují také v přední části těla (Sedlák 2005).

Pohlavní orgány samců (obrázek 1) jsou tvořeny semeníkem, který přechází do semenovodu vyúsťujícího do semenného váčku, který je vyveden společně se střevem do kloaky. V okolí kloaky je umístěna kopulační bursa skládající se ze dvou dlouhých laterálních laloků a malého asymetrického dorzálního laloku, které jsou vyztuženy žebry. Ventrální žebra vystupující ze společného stvolu se na konci rozvětvují a směřují dopředu. Laterální žebra také vystupují ze společného stvolu, ale jako první se odděluje žebro posterolaterální a směřuje dozadu stejně jako mediolaterální žebro, které se odděluje dále. Pomocné pohlavní orgány pomáhající k přichycení těl samce a samice, spikuly, jsou krátké, masivní a mohou být v distálních částech až nitkovité. Jejich délka se pohybuje v rozpětí 0,460 – 0,506 mm (Gunn a Pitt 2012, Jurášek a Dubinský 1993).

Pohlavní orgány samic (obrázek 1) se skládají z vaječnicků, vejcovodů a trubicovité dělohy. Vytvářejí krátkou vagínu, která na povrch těla vyúsťuje vulvou v zadní části těla. Často bývá chráněna kutikulární chlopní. Ve vaječnicích probíhá tvorba stovek oocytů denně, které prostřednictvím vejcovodů přecházejí do dělohy, kde dochází k oplodnění spermii a vytvoření obalů. Vajíčka mají rozměr mezi 70 - 85 x 41 - 48  $\mu\text{m}$  (Gunn a Pitt 2012, Jurášek a Dubinský 1993).



**Obrázek 1** Porovnání samčího (a) a samičího (b) těla s detailním záběrem jejich pohlavních orgánů ([http://www.sheepmagazine.com/27-5/john\\_kirchhoff/](http://www.sheepmagazine.com/27-5/john_kirchhoff/); [http://www.nehu.ac.in/BIC\\_backup09032009/HelMintH\\_Parasite\\_NE/Haemonchus%20contortus.htm](http://www.nehu.ac.in/BIC_backup09032009/HelMintH_Parasite_NE/Haemonchus%20contortus.htm))

## 2.2 Vývojový cyklus

Jelikož *H. contortus* patří mezi parazity s přímým životním cyklem, nepotřebuje pro dokončení svého vývoje žádného mezipřehostitele. Larvální stadium můžeme rozlišovat na pět stadií ( $L_1 - L_5$ ), při kterých dochází k vývinu z nižšího stadia na vyšší prostřednictvím svlékání. Vývoj larev od  $L_1$  do  $L_3$  probíhá ve vnějším prostředí (geohelminth), kde následně dochází k nákaze hostitele.  $L_1$  a  $L_2$  se živí bakteriemi, zatímco  $L_3$  žije z vytvořených zásob, protože není schopno přijímat potravu

kvůli přítomnosti kutikuly z L<sub>2</sub>, která má ochrannou funkci. Díky této kutikule je schopné L<sub>3</sub> odolat i velmi nepříznivým podmínkám na rozdíl od neinfekčních larev (L<sub>1</sub> a L<sub>2</sub>), které snadno umírají v suchém prostředí a při náhlých výkyvech tepla. V zaschnutém stavu dokáží přežít až rok a ve vlhkém stavu jsou schopny snést teplotu až 50 °C (Jurášek a Dubinský 1993, Volf a Horák 2007).

Larvy L<sub>1</sub> se za příznivých vnějších podmínek líhnou z vajíček za 14 – 17 hod. V průběhu vývinu infekčního larválního stadia L<sub>3</sub> dojde dvakrát ke svléknutí. Tento proces trvá za optimálních podmínek 3 – 4 dny. Při nižších teplotách se tento děj může prodloužit až na týdny i měsíce. Larva L<sub>3</sub> se do těla hostitele dostane perorální cestou prostřednictvím potravy. Infekční stadium intenzivně migruje na vlhkou trávu, a proto k nákaze hostitele nejčastěji dochází při pasení za rosy a po dešti. Larva v hostiteli podléhá třetímu a čtvrtému svlékání, při kterém dochází k těsnému přilehnutí na žlázy slezu. Při posledním svlékání se vyvíjí zub, který slouží k získávání krve z cév slezu. Pohlavně zralé nematody jsou schopny samovolného pohybu po sliznici a přichycují se pouze při získávání krve. Období od nákazy hostitele po produkci vajíček parazitem se nazývá prepatentní perioda a liší se podle druhu hostitele. Například u ovcí je dlouhá 2 - 3 týdny a u hovězího dobytka 4 týdny (Jurášek a Dubinský 1993, Volf a Horák 2007).

## 2.3 Patogeneze, klinické projevy a diagnostika

Dospělci *Haemonchus contortus* narušují slizniční stěny slezu, kvůli získání krve, kterou se nematoda živí. Patogenními nejsou pouze dospělí jedinci, ale už i larvy L<sub>4</sub>. Odhaduje se, že jeden jedinec za den způsobí ztrátu 0,05 ml krve. Silnější nákaza může u hostitele vyvolat vznik anémie, abomasitidy a atroficko-degenerativní změny slezu. Sekundárně se může objevit porucha kostní dřeně, parenchymatózních orgánů a žláz s vnitřní sekrecí. Velmi silný průběh infekce může vyvolat i úhyn zvířete, a to hlavně mláďat. Chronická haemonchóza se nejčastěji projevuje výraznou ztrátou hmotnosti a změnami v počtu erytrocytů (Jurášek a Dubinský 1993).

Z klinických projevů se často objevuje nechutenství, průjem nebo zácpa, anémie a celková slabost organismu. Za 6 – 12 dní od infekce se může objevit krev v trusu. Dále se může objevit horečka doprovázená otoky (Jurášek a Dubinský 1993).

Flotačními koncentračními metodami fekálií můžeme určit jen všeobecnou diagnózu přítomnosti parazita z řádu *Strongylyda*. K určení rodu je nezbytné založit koprokulturu a konkrétní typ infekční larvy L<sub>3</sub> se stanoví pomocí různého chvostového zakončení u jednotlivých rodů (Jurášek a Dubinský 1993). Někdy tato diagnostika může vykazovat falešně negativní výsledky, a to v případě akutní infekce, kdy se může objevit anémie, případně úhyn hostitele, ještě před tím, než parazit dosáhne dospělosti a začne produkovat vajíčka (Kaufmann 1996).

Jednotlivé druhy rodu *Haemonchus spp.* mají určité morfologické odlišnosti, kterými je lze od sebe rozeznat. Jedním z charakteristických znaků je rozdílný tvar pohlavních orgánů. Pro identifikaci se více hodí samčí pohlavní orgány, jelikož u nich není tak častý výskyt anomálií jako u samičích (Gibbons 1979). Konkrétním příkladem může být různá délka spikulí u jednotlivých druhů, které se liší v závislosti na místě původu parazita (Talamini do Amarante 2011). Dalším rozdílným znakem je například velikost a tvar infekčního L<sub>3</sub> (Roberts *et al.* 1954).

## **3 TERAPIE HELMINTÓZ**

Helmintózy jsou infekční onemocnění, jejichž původcem jsou červi nebo jejich infekční larvální stadia. Mezi červem a hostitelem je parazitický vztah. Helmintóza může postihnout všechny obratlovce, u nichž se může toto onemocnění projevit přímou i nepřímou ztrátou v chovatelské, produkční a reprodukční užitkovosti. Anthelmintika jsou většinou syntetického nebo biosyntetického původu. Mezi nejčastější třídy původců helmintóz patří hlístice (*Nematoda*), motolice (*Trematoda*) a tasemnice (*Cestoda*). Podle účinnosti proti jednotlivým třídám parazitů se anthelmintika dělí na antinematoda, antitrematoda a anticestoda (Lamka a Ducháček 2006).

### **3.1 Farmakoterapie a farmakoprophylaxe**

Pro správnou terapii helmintóz je důležité kombinovat zoohygienická opatření s využíváním patřičného léčiva s anthelmintickým účinkem (Lamka a Ducháček 2006). Dnes se zpravidla používají přípravky s širokým spektrem účinku na více skupin helmintů (Jurášek a Dubinský 1993).

Nematodózy postihují téměř všechny druhy hospodářských i zájmově chovaných zvířat a jsou z hlediska druhově-parazitologického nejrozšířenější skupinou helmintóz. Některá antinematoda vykazují i účinnost proti trematodám a cestodám. Nejběžnější představitelé antinematod spadají do skupin makrocyclických laktonů, benzimidazolů a imidazothiazolů (Lamka a Ducháček 2006). Poměrně nedávno se na trhu objevila i nová léčiva, jako jsou emodepsid, derquantel a monepantel (Epe a Kaminsky 2013).

#### **3.1.1 Makrocyclické laktony**

Makrocyclické laktony jsou látky vykazující velmi dobrou účinnost proti širokému spektru nematod, a to již při nízkých dávkách. Původní představa o mechanismu jejich účinku byla spojována s ovlivněním nervového přenosu zprostředkovaného  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinou (GABA), ale novější studie potvrdily, že dochází k ovlivnění glutamátém řízených chloridových kanálů. Makrocyclické laktony se váží na glutamátové receptory, čímž dojde k otevření chloridových kanálů a následně

hyperpolarizaci membrány neuronů. To má za následek paralýzu a následnou smrt daných parazitů. Nevýhodou této skupiny je neúčinnost proti cestodám a trematodám (Lynn 2009).

Jedním z nejvýznamnějších léčiv veterinární medicíny ze skupiny makrocyclických laktonů je ivermektin. Jeho účinek je zaměřen proti vývojovým i dospělým stádiím hlístic a členovců. Má poměrně široké spektrum indikačního uplatnění. Aplikuje se jak formou injekční, tak i enterální a jednotlivá terapeutická dávka se pohybuje mezi 0,2 – 0,3 mg/kg hmotnosti zvířete (Lamka a Ducháček 2006).

### **3.1.2 Benzimidazoly**

Benzimidazoly jsou nejrozsáhlejší skupinou anthelmintik odvozenou od jediné chemické struktury. Jsou považovány za anthelmintika s velmi širokým spektrem účinku. Obecně je jejich účinek zaměřen na léčbu onemocnění způsobených nematodami, trematodami a cestodami. Výjimečně vykazují i antimykotickou aktivitu a nedávné studie potvrdily i možnost využití při terapii giardiózy (protozoóza) (Ducháček a Lamka 2006).

Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na molekuly tubulinu, čímž inhibují tvorbu mikrotubulů a tím narušují buněčné dělení a transport některých molekul (např. glukózy). Benzimidazoly mají mnohem větší míru afinity k tubulinu nematod než k savčímu tubulinu, a proto vykazují výraznou selektivitu proti parazitům. Benzimidazoly dále inhibují fumarátreduktázu, což vede k narušení mitochondriálních funkcí, které způsobí odumření parazita v důsledku energetického vyčerpání (Lynn 2009).

Anthelmintická účinnost spočívá na době přetrvávání terapeutických hladin léčiva v tělních tekutinách a tkáních. U monogastrických zvířat (např. pes, kočka, prase) je většinou nezbytné opakované podávání léčiva, zatímco u polygastrických zvířat (např. skot, ovce, koza) je možné podávat benzimidazoly jen v jedné dávce. Zvýšení absorpce lze dosáhnout aplikací léčiva společně s potravou. Kromě vlastních benzimidazolových léčiv jsou využívána i jejich proléčiva (febantel). Proléčiva jako taková nevykazují anthelmintickou aktivitu, ale v těle hostitele se pomocí metabolismu stávají biologicky aktivními (Ducháček a Lamka 2006).

Mezi nejvýznamnější benzimidazoly patří například albendazol, mebendazol, flubendazol. Albendazol má široké spektrum anthelmintické aktivity a vykazuje vysokou míru bezpečnosti. Používá se proti gastrointestinálním a plicním nematodám včetně odolných larválních stadií, dále proti cestodám a proti plicním a jaterním trematodám (Lynn 2009).

### **3.1.3 Imidazothiazoly**

Imidazothiazoly jsou agonisté nikotinu, čímž způsobují narušení neuromuskulárního systému. Tím dojde ke kontrakci svalstva a následně k celkové paralýze parazita. Nikotin-acetylcholinové receptory bezobratlých parazitů hrají zásadní roli při neuromuskulárních dějích, ale v porovnání se savčími se liší jak ve fyziologii, tak i v distribuci. Imidazothiazoly také ovlivňují fumarátreduktázu, která hraje klíčovou roli při mitochondriálním energetickém metabolismu (Lynn 2009).

Významným představitelem skupiny imidazothiazolů je levamizol, který našel významné uplatnění ve veterinární medicíně. Může být aplikován orálním nebo subkutánním způsobem a je využíván při infekcích způsobených gastrointestinálními nebo plicními nematodami (Lynn 2009).

### **3.1.4 Amino-acetonitrilové deriváty**

Amino-acetonitrilové deriváty (AAD) jsou novou skupinou širokospektrých anthelmintik, které byly objeveny v roce 2008 společností Novartis Animal Health. *N*-acyl amino-acetonitrilové deriváty byly známy už dříve, ovšem v literatuře byly označovány jako látky fungicidní, antibakteriální a insekticidní, ale ne jako potenciální anthelmintika (Ducray *et al.* 2008).

AAD jsou nízkomolekulární látky připravené alkylací fenolu s chloracetonem, následovanou Streckerovou syntézou a alkylací aminu s aroyl chloridem (Ducray *et al.* 2008, Kaminsky *et al.* 2008a). Z široké nabídky AAD byl vybrán jako kandidát na nové anthelmintikum monepantel (MOP), který prokázal dostatečnou účinnost a snášenlivost u ovcí a hovězího dobytka. Při testování prováděného na hlodavcích se ukázalo, že dávka 0,32 mg racemátu/kg byla účinná proti *H. contortus* a *Trichostrongylus colubriformis* (Kaminsky *et al.* 2008b). Oba enantiomery této látky



byly izolovány a byla zjišťována jejich účinnost. Při dávce 1 mg/kg racemická směs vykazovala účinnost 84 – 100 % (S-enantiomer 99 - 100 %, R-enantiomer nevykazoval žádnou anthelmintickou účinnost) (Kaminsky a Rufener 2012).

Doporučená dávka účinná proti všem hlavním gastrointestinálním nematodám, včetně rezistentních na benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony a kombinaci derquantelu a abamektinu, je 2,5 mg MOP/kg (Bustamante *et al.* 2009, Hosking *et al.* 2010, Kaminsky *et al.* 2009, Kaminsky *et al.* 2011, Sager *et al.* 2009).

MOP způsobuje hyperkontrakci svalstva tělní stěny (spastická kontrakce přední části hltanu) vedoucí k paralýze a následné smrti. Tento účinek je způsoben prostřednictvím specifického nikotin-acetylcholinového receptoru (Kaminsky *et al.* 2008a). Navázání MOP na tento receptor zapříčiní otevření iontových kanálů, které nejsou schopny opětovného uzavření, a tím dojde k depolarizaci svalových buněk, což vede k paralýze (Epe a Kaminsky 2013).

MOP vykazuje vysokou míru bezpečnosti, a to z toho důvodu, že účinkuje prostřednictvím receptoru specifického pro nematoda. Bezpečnostní studie prokázaly, že podání pětinasobně vyšší maximální doporučené dávky každé tři týdny po dobu 8 opakování vykazovalo dobrou snášenlivost (Hosking 2010). Toxická dávka byla u hlodavců stanovena na více než 2 000 mg/kg (Kaminsky a Rufener 2012).

V lednu 2009 byl MOP na Novém Zélandu schválen jako perorální anthelmintikum u ovcí. Dále začal být používán i v zemích, jako jsou například Francie, Velká Británie, Austrálie, Německo, Švýcarsko a další. Prodává se pod komerčním názvem Zolvix<sup>®</sup> (Kaminsky a Rufener 2012).

### **3.2 Jiné možnosti léčby**

Z důvodu rozšiřující se rezistence na všechny druhy používaných anthelmintik, již nestačí použití farmakoterapie k potlačení onemocnění způsobených nematodami. Je zapotřebí vyvíjet a aplikovat i další alternativní nebo podpůrné metody, kterými se zajistí udržení helmintóz pod kontrolou. Do těchto metod můžeme například zahrnout řízení pastvy, biologickou kontrolu, obohacení stravy a vakcinaci (Stear *et al.* 2007).

### **3.2.1 Řízení pastvy**

Snížením počtu chovaných zvířat na určité území může přispět k nižšímu počtu infekcí. Menší počet infikovaných jedinců vede k menší kontaminaci pastvy a ostatní zvířata se snáze vyhnou pasení se v okolí trusu s vajíčky a následně s infekčními stadii (Stromberg 1997).

Další možnost, jak omezit intenzitu infekce nematodami, spočívá ve změně míst pastvy. Pastvina by měla být rozdělena do několika sekcí, na kterých by docházelo k cyklování pasoucích se zvířat. Důležité je dodržet dostatečně dlouhou dobu jednoho cyklu tak, aby za dobu nepřítomnosti pasoucích se zvířat došlo k odumření infekčních stadií nematod (Stear *et al.* 2007). Tato doba se liší v závislosti na druhu infekčních stadií a klimatických podmínkách (Callinan *et al.* 1982).

Jako vhodné se ukázalo i střídání druhu zvířat pasoucích se na určitém území, jelikož řada patogenů není schopna infikovat různé živočišné druhy. Výjimkami jsou blízké příbuzné druhy, jako jsou například ovce a kozy (Stear *et al.* 2007).

Střídání mladých a starých jedinců na pastvě se ukázalo být také výhodné, protože starší jedinci jsou zpravidla odolnější vůči infekci a objevuje se u nich nižší počet vajíček v trusu. Navíc produkují větší množství exkrementů, čímž dochází ke snížení koncentrace vajíček v trusu (Stromberg 1997).

### **3.2.2 Biologická kontrola**

Tato metoda spočívá v redukci intenzity infekce nematodami pomocí jejich přirozených predátorů. Jedním z nich je například houba *Duddingtonia flagrans*, která je schopna redukovat počet infekčních larev na pastvě a snížit intenzitu a vážnost infekce (Waller *et al.* 2004). Pro dosažení optimálního účinku by tato houba měla být obsažena v každodenní stravě (Waller a Thamsborg 2005).

Zahrnutí některých rostlin (*Cichorium intibus*, *Lotus corniculatus*) do stravy se u parazitů ovcí projevilo nižší produkcí vajíček (Waller a Thamsborg 2005). Tohoto efektu je pravděpodobně docíleno tím, že došlo ke zvýšení proteinové složky ve stravě, což vedlo k podpoře imunitního systému hostitele, ke snížení poškozování tkání díky lepšímu hojení, ke snížení vývoje nebo přežívání volně žijících stadií parazita, ke snížení schopnosti larev infikovat hostitele nebo k přímé toxicitě vůči nematodám.

Tato metoda je poměrně atraktivní, ale nevýhodou je, že není dosahováno stejných výsledků ani v případě stejných parazitů a hostitelů (Marley *et al.* 2003).

### **3.2.3. Obohacení stravy**

Při všech infekčních onemocněních, včetně těch parazitických, hraje zásadní roli imunitní systém. Ten je potřeba podpořit správným složením stravy, kde by měl být obsažen dostatečně velký podíl bílkovin a minerálních prvků jako jsou železo, zinek, měď a molybden. Dostatečná suplementace stravy těmito složkami má významný vliv na odolnost organismu vůči infekcím způsobeným nematodami (Coop a Kyriazakis 2001, Koski a Scott 2003, Stear *et al.* 2003).

Doplnění stravy o proteiny je poměrně drahá záležitost. Naštěstí u přežvýkavců se může nahradit podáváním levnější močoviny, která je pravděpodobně díky bakteriím v batoru přeměňována na aminokyseliny a ty jsou následně vstřebávány a využívány k syntéze tělu vlastních bílkovin (Stear *et al.* 2007).

### **3.2.4 Vakcinace**

Je známo už řadu let, že při opakovaném výskytu například *H. contortus* může u některých jedinců dojít ke vzniku rezistence na tohoto parazita. Hypersenzitivní ovce, která již prodělala infekci tímto parazitem, je schopna se při další infekci sama vyléčit bez jakéhokoli vnějšího zásahu. Tento děj je spojen se zvýšením množství protilátek v krevním oběhu (Stewart 1953), které jsou schopny rozpoznat přítomnost pozdního larválního stadia a dospělých jedinců (Balic *et al.* 2002, Miller 1978). Imunitní odpověď je multifaktoriální a doprovází ji zvýšená produkce protilátek v místě usídlení parazitů (Miller 1978). Zjištění těchto okolností vedlo k identifikaci, čištění a testování kandidátů na vytvoření různých vakcín (Emery a Wagland 1991).

Vývoj vakcín bychom mohli rozdělit do tří kategorií v závislosti na jejich strategii. Jsou to vakcíny s oslabenými patogeny, vakcíny založené na přirozené imunitě a metoda hledání skrytého antigenu (Stear *et al.* 2007).

Jediné komerčně dostupné vakcíny obsahující oslabené jedince jsou účinné proti některým parazitům z řádu *Strongylida* parazitujících u ovcí a hovězího dobytka (Bain 1999, Newton a Munn 1999). Tyto vakcíny obsahují oslabené larvy parazitů,

kteřé ovšem nezpůsobují vznik rezistence u mladých jehňat (Mulligan *et al.* 1961), jelikož imunitní systém ovcí se vyvíjí až do stáří dvanácti měsíců (Hein a Mackay 1991, Watson a Gill 1991) a pro získ rezistence například proti *H. contortus* musí být daný jedinec starý aspoň šest měsíců (Manton *et al.* 1962).

Vývoj vakcín založených na přirozené imunitě vychází ze studia parazitických molekul rozpoznánych imunitním systémem hostitele při umělém nebo přirozeném nakažení jedinců. V průběhu přirozené infekce je imunitní systém hostitele schopen rozpoznat široké spektrum parazitických molekul (Hilderson *et al.* 1993, McCrie *et al.* 1997, Schallig *et al.* 1994), na jejichž základě se může stát imunním jedincem (Stear *et al.* 2005).

Poslední strategií vývoje vakcín je metoda hledání skrytých antigenů. Jako skryté antigeny se označují molekuly, které jsou produkovány parazity a jsou schopny vyvolat zánětlivou reakci. Ovšem za normálních okolností k aktivaci imunitního systému nedochází, a to z toho důvodu, že se tyto skryté antigeny nedostanou do kontaktu s buňkami hostitele. Vhodnými kandidáty se staly parazitické proteiny gastrointestinálního traktu, které v klinických studiích vedly ke vzniku účinné imunity (Knox *et al.* 2003).

## **4 REZISTENCE**

Za rezistenci je považován stav, při kterém rezistentní populace parazitů je schopna přežít terapeutické dávky léčiva na rozdíl od citlivé populace stejného druhu. První případ rezistence na anthelmintika byl evidován u *H. contortus* parazitujícího u ovcí na konci padesátých let minulého století (Drudge *et al.* 1957). V roce 1961 byl představen thiabendazol jako první anthelmintikum, které kombinuje účinnou širokospektrální anthelmintickou aktivitu s nízkou toxicitou. Stal se jedním z často používaných anthelmintik, avšak během několika let se objevila na tuto látku rezistence opět v případě *H. contortus* parazitujícího u ovcí a následně i u jiných nematod (Conway 1964, Drudge *et al.* 1964). V současné době se používají při léčbě hospodářských zvířat především jen širokospektrá anthelmintika ze tří kategorií (benzimidazoly, makrocyclické laktony a imidazothiazoly). Vývoj rezistence na tyto látky je velkým problémem, jelikož se následně projevuje vyšší morbiditou a mortalitou, což může způsobit rozsáhlé ekonomické ztráty (Taylor *et al.* 2002).

Nejvýznamnějším faktorem vzniku rezistence je četnost aplikace anthelmintika, časté nebo dlouhodobé užívání stejného léčiva nebo léčiv se stejným mechanismem účinku (Bodeček a Koudela 2010). Příkladem může být porovnání účinnosti běžně používaných anthelmintik (např. benzimidazoly) a trichlorfonu proti multirezistentním kmenům *H. contortus*. Pro svou poměrně vysokou toxicitu není trichlorfon preferovaným anthelmintikem a nejspíš právě proto stále vykazuje, na rozdíl od benzimidazolů, vysokou účinnost (přes 70 %) i proti multirezistentním kmenům (Almeida *et al.* 2010, van Wyk *et al.* 1997).

Další možnou příčinou vzniku rezistence může být podávání nedostatečně velkých dávek anthelmintik nebo podávání terapeutických dávek neadekvátním způsobem, při kterém se nedosáhne požadované koncentrace léčiva v místě účinku. V tomto případě nemusí dojít k usmrcení heterozygotních jedinců, kteří nesou gen rezistence, čímž způsobí vznik nové imunní populace. Z toho důvodu se standardně raději podávají dávky anthelmintika o něco větší než menší (Bodeček a Koudela 2010).

Dříve často docházelo ke střídání různých skupin anthelmintik v průběhu období kratšího než jeden rok. Tento způsob se dnes již nepraktikuje, jelikož se ukázalo, že rychlá rotace nejspíš způsobuje vznik multirezistentních kmenů. Dnes se používá způsob pomalé rotace, při které dochází ke změně anthelmintika s různým

mechanismem účinku v ročních intervalech, čímž se snižuje riziko přežití rezistentních parazitů k léčivu použitému v předchozím roce (Bodeček a Koudela 2010).

Mechanismus vzniku rezistence by se dal rozdělit na farmakokinetický a farmakodynamický typ. V prvním případě dochází ke sníženému přijímání léčiva do organismu, k jeho snadnějšímu vylučování a k rychlejší metabolické inaktivaci, což je způsobeno vyšší aktivitou transportérů nebo biotransformačních enzymů. Tímto způsobem dochází k nižší koncentraci léčiva v těle organismu a tím i k nižšímu účinku. Tento typ rezistence se dá jednoduše obejít zvýšením dávky léčiva. Farmakodynamický typ zahrnuje zvýšení počtu cílových makromolekul nebo změnu v jejich struktuře. Oba tyto děje vedou k nižšímu účinku léčiva (Cvilink *et al.* 2009). Pokud se anthelmintikum není schopno navázat na cílovou makromolekulu, tak ani zvýšení dávky podávaného léčiva nezpůsobí zvýšení účinku (Alvarez *et al.* 2005).

## ***5 METABOLISMUS XENOBIOTIK***

Každé xenobiotikum přijaté do organismu vykazuje určitou míru zátěže a nebezpečí, a proto existují metabolické procesy, které se snaží omezit vstup xenobiotika do dalších orgánů a tkání, snížit jeho potenciální toxicitu a usnadnit eliminaci z organismu (Skálová a Boušová 2011). Biotransformace xenobiotik představuje proces přeměny lipofilních látek, které jsou snadno vstřebatelné například z gastrointestinálního traktu, na látky hydrofilní, které se lépe vylučují z organismu (Parkinson 2001). Metabolismus xenobiotik je závislý na jejich chemické struktuře a je významně ovlivňován všemi aspekty molekulární struktury včetně geometrických a elektrochemických vlastností. Významnou roli při vazbě xenobiotika na biotransformační enzymy má lipofilita, distribuce elektronů a ionizace molekuly. Elektrochemické vlastnosti a konformace xenobiotika jsou určující pro vlastní enzymovou katalýzu. Metabolismus xenobiotik se skládá z biotransformačních reakcí a z transportních procesů. Biotransformační reakce se člení na první a druhou fázi metabolismu. Transport xenobiotika nebo jeho metabolitů bývá označován jako třetí fáze metabolismu (Skálová a Boušová 2011).

### ***5.1 První fáze biotransformace***

Při první fázi, nazývané též jako konverze (Skálová a Boušová 2011), probíhají hlavně oxidační, redukční a hydrolytické reakce, čímž dochází k odkrytí nebo zabudování funkčních skupin (Cvilink *et al.* 2009).

Oxidací je přeměňována řada xenobiotik především u aerobních vyšších organismů. Mezi oxidační biotransformace patří oxidace alkoholů a aldehydů, hydroxylace, oxidační deaminace, dealkylace, oxidační dehalogenace, N-oxidace a S-oxidace (Skálová a Boušová 2011). Při hydroxylaci dochází k zavádění hydroxylové skupiny do struktury molekuly především prostřednictvím substituce funkční skupiny nebo vodíkového atomu (Ullrich a Hofrichter 2007). Tato reakce bývá často pozorována u xenobiotik s alifatickým řetězcem nebo aromatickým kruhem, kdy pomocí zavedení hydroxylové skupiny do molekuly xenobiotika dojde ke snížení lipofility a navíc vzniklé hydroxyderiváty mohou snadno podléhat dalším konverzním nebo konjugačním reakcím. Produktem hydroxylace mohou být i silně reaktivní sloučeniny, které vykazují vyšší toxicitu než původní látka (např. tvorba epoxidů

polycyklických aromatických uhlovodíků) (Skálová a Boušová 2011). Sloučeniny obsahující síru ve své molekule mohou být oxidovány za vzniku S-oxidů nebo sulfonů za přítomnosti cytochromů P450 (CYP450), ale může probíhat i pomocí flavinových monooxygenáz (FMO). Nejběžnějšími substráty jsou thiooly, sulfidy a disulfidy (Utrecht a Trager 2007).

Hydrolytickým biotransformačním reakcím podléhají především estery, epoxidy, amidy, hydrazidy a karbamáty. Tato reakce může probíhat i za nepřítomnosti enzymu, ale ve většině případů je katalyzována různými hydrolázami, které jsou pojmenovány podle hlavních substrátů (např. esterázy, amidázy, peptidázy). Skládají se z polypeptidového řetězce, neobsahují žádnou prostetickou skupinu a nevyužívají žádné kofaktory. Při hydrolýze esterů, thioesterů a amidů vznikají vždy patřičné karboxylové kyseliny a v závislosti na přítomném heteroatomu thiooly, alkoholy nebo aminy (Skálová a Boušová 2011). V případě nitrilů může hydrolýza probíhat dvojitým způsobem. Jedním způsobem je dvoukroková reakce, kdy nejprve dojde k hydrataci nitrilu pomocí nitrilhydratázy, čímž se vytvoří patřičný amid. Následuje vznik karboxylové kyseliny a amoniaku za působení amidázy (Asano *et al.* 1980). Druhý způsob zahrnuje přímou hydrolýzu a vznik karboxylové kyseliny a amoniaku pomocí enzymu nitrilázy (Harper 1977). Byl popsán i proces vzniku amidové skupiny z nitrilové za působení nitrilázy, která již není schopna dále hydrolyzovat vzniklý amid na karboxylovou kyselinu (Fernandes *et al.* 2006). Hydrolýze podléhají i některé metabolity druhé fáze biotransformace. Glukuronidy a sulfátové sloučeniny mohou být hydrolyzovány na původní látky pomocí katalýzy glukuronidáz a sulfatáz. Tyto reakce probíhají ve střevě za působení bakteriálních enzymů nebo enzymů střevní stěny a umožňují dané látky se znovu vstřebat díky enterohepatálnímu oběhu (Ding *et al.* 2013, Skálová a Boušová 2011). Dále probíhá hydrolýza i u konjugátu s glutathionem, kde dojde pomocí  $\gamma$ -glutamyltranspeptidázy a aminopeptidázy k odštěpení glutamátu a glycinu (obrázek 3) (Skálová a Boušová 2011). Hlavními hydrolázami, které se účastní biotransformace xenobiotik, jsou karboxyesterázy, cholinesterázy a paraoxonázy. První dvě jmenované skupiny jsou také známé jako serinové hydrolázy, jelikož jejich katalytické místo obsahuje nukleofilní serinový zbytek, který se podílí na hydrolytické aktivitě (Parkinson 2001).

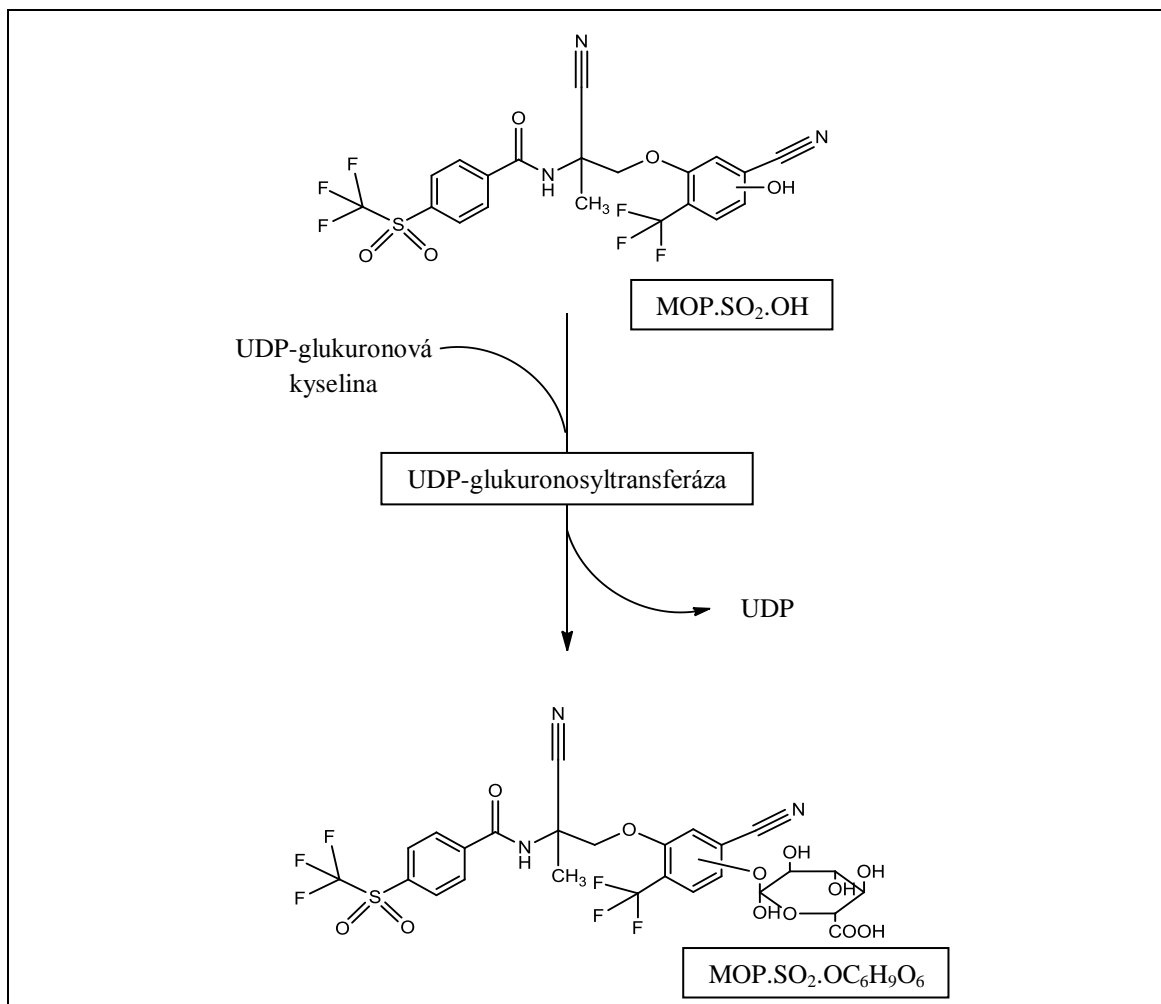


## 5.2 Druhá fáze biotransformace

Ve druhé fázi biotransformace probíhají konjugační reakce endogenních sloučenin s xenobiotikem nebo s jeho metabolitem, který vznikl v první fázi. Pro průběh konjugace je nezbytné dodání energie, proto je nutné, aby konjugační činidlo, kterým je endogenní látka, bylo aktivováno s makroergním kofaktorem. Vzniklé konjugáty většinou vykazují menší biologickou aktivitu a jsou hydrofilnější než původní xenobiotikum. Konjugačních reakcí je mnoho typů a průběh konkrétního typu reakce u určité sloučeniny se odvíjí především od její struktury. Nejvýznamnější roli hraje přítomnost funkčních skupin molekuly, prostorové uspořádání a elektronové vlastnosti (Skálová a Boušová 2011). Mezi nejběžnější reakce druhé fáze biotransformace patří glukuronidace, sulfatace, methylace, glukosidace, konjugace s glutathionem a konjugace s aminokyselinami (Cvilink *et al.* 2009).

Konjugace s kyselinou glukuronovou je hlavní reakcí druhé fáze biotransformace xenobiotik u všech savců kromě kočkovitých šelem (Tukey a Strassburg 2000). Kofaktorem této reakce je UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA). Samotná glukuronidace je katalyzována enzymem UDP-glukuronosyltransferázou (UGT) (obrázek 2). Tyto enzymy jsou situovány na membráně hladkého endoplazmatického retikula, kde jsou orientovány do jeho lumina (Skálová a Boušová 2011). Průběh glukuronidace se řídí mechanismem nukleofilní substituce druhého řádu (Miners a Mackenzie 1991, Radominska-Pandya *et al.* 1999, Tukey a Strassburg 2000), jehož důsledkem je vznik konjugátu s konfigurací  $\beta$ -D (Rowland *et al.* 2013).

Konjugaci s kyselinou glukuronovou podléhá celá řada jak exogenních, tak endogenních sloučenin (Miners a Mackenzie 1991). Nejčastěji probíhá u látek, které obsahují ve své molekule nukleofilní heteroatom (O, N, S). Typickými substráty jsou alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny tvořící O-glukuronidy, aminy a amidy tvořící N-glukuronidy a thioly tvořící S-glukuronidy. Glukuronidy jsou polární, ve vodě rozpustné sloučeniny, které jsou z organismu vylučovány močí nebo žlučí v závislosti na své molekulové hmotnosti (Parkinson 2001). Vzniklé konjugáty téměř vždy vykazují menší toxicitu a biologickou aktivitu než původní látka (Parkinson 2001, Skálová a Boušová 2011).



**Obrázek 2** Proces glukuronidace (převzato z Testa a Kämer 2010)

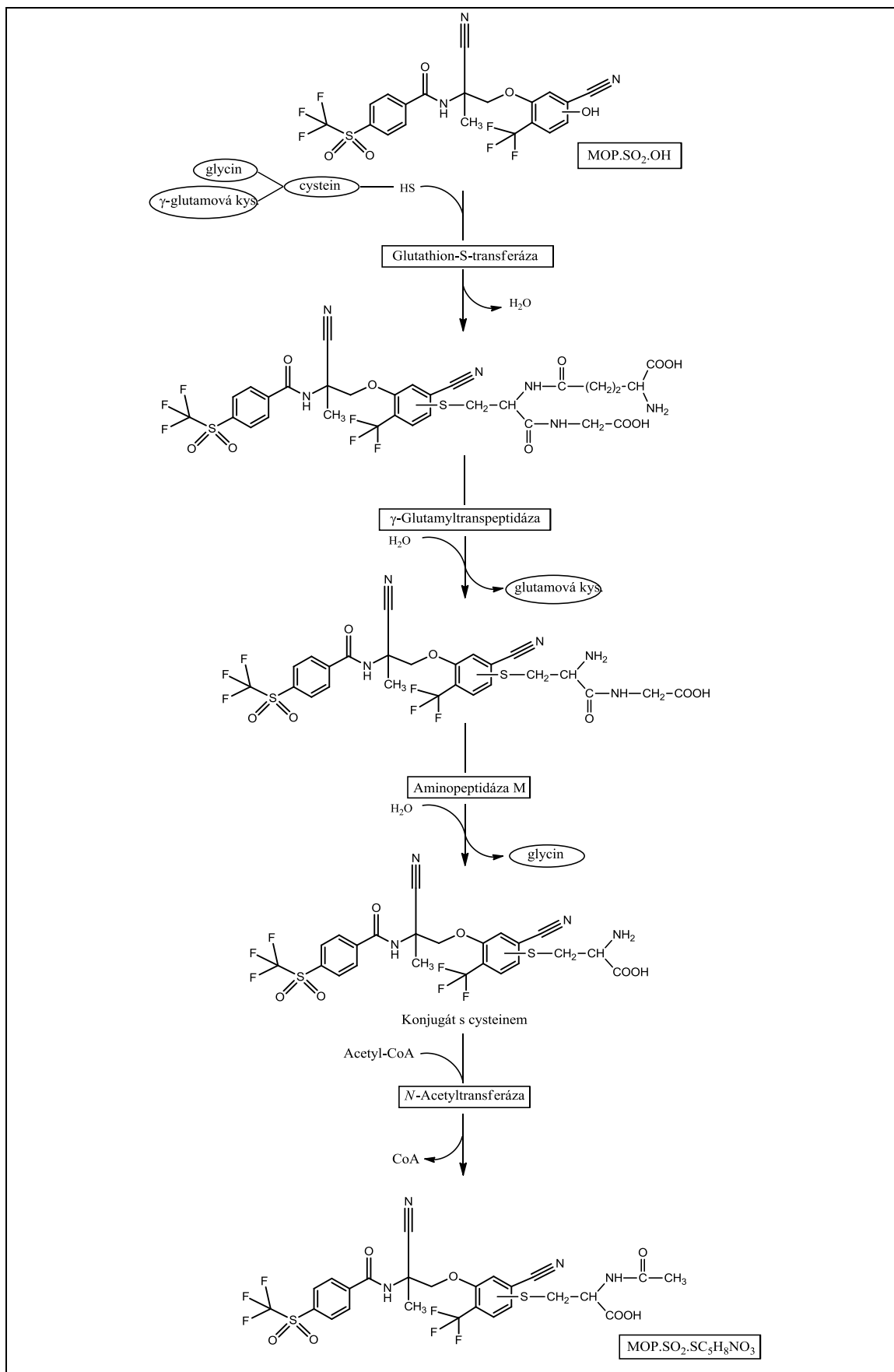
Jednou z nejvýznamnějších reakcí druhé fáze biotransformace jak u savců, tak i u helmintů je konjugace s glutathionem (Cvilink *et al.* 2009). Kofaktorem této reakce je endogenní tripeptid glutathion (GSH), který je v organismu syntetizován dvoustupňovou reakcí z aminokyselin glutamátu, cysteinu a glycinu. První reakci řídí enzym  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetáza a druhou glutathionsyntháza. Pro průběh těchto reakcí je nezbytná přítomnost adenosintrifosfátu (ATP) (Skálová a Boušová 2011).

Na rozdíl od glukuronidace může konjugace s GSH probíhat i spontánně bez přítomnosti katalyzujícího enzymu glutathion-S-transferázy (GST), který urychluje průběh reakce.

Neenzymový průběh je umožněn mimo jiné i díky vysoké intracelulární koncentraci GSH. Takto vzniklé konjugáty jsou zpravidla lépe rozpustné ve vodě a vykazují nižší toxicitu než původní látka. Z organismu jsou eliminovány žlučí nebo jsou dále přeměněny na deriváty merkapturové kyseliny (acetylcystein) a vyloučeny močí. Tato přeměna se skládá nejprve z odštěpení glutamylového zbytku pomocí

$\gamma$ -glutamyltranspeptidázy, dále dojde za účinku aminopeptidáz k odštěpení glycylového zbytku a na závěr je molekula působením *N*-acetyltransferázy podrobena *N*-acetylaci (obrázek 3) (Skálová a Boušová 2011).

GST se také podílí na ochraně tkání před oxidativním poškozením způsobeným vytvářením reaktivních peroxidů (např. hydroxyperoxy fosfolipidů, mastných kyselin, DNA) pocházejících buď z endogenního metabolismu parazita nebo imunitního systému hostitele (Hayes a Strange 1995).



**Obrázek 3** Proces konjugace s glutathionem a následná metabolická přeměna na konjugát s acetylcysteinem (převzato z Testa a Kámer 2010)

## **6 METODY STANOVENÍ METABOLITŮ XENOBIOTIK**

### **6.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je fyzikální separační metoda, při níž dochází k oddělování jednotlivých složek na základě afinity ke dvěma vzájemně nemísitelným fázím. Tyto fáze jsou označovány jako stacionární a mobilní. Během pohybu analytu společně s mobilní fází podél stacionární fáze dochází k opakované sorpci a desorpci. K separaci dochází na základě rozdílných distribučních koeficientů jednotlivých vzorků analytu (Niessen 2006).

Jedná se o jednu z nejčastěji používaných analytických metod, jejíž výhodou je schopnost kvantitativního i kvalitativního hodnocení separovaných složek v poměrně krátké době. Pro průběh analýzy je zapotřebí malého množství vzorku. Celý proces je možné automatizovat použitím automatického dávkovače (Klimeš 2011).

Nejběžněji se při této analytické metodě používají kolony z nerezové oceli nebo skla, které bývají dlouhé 10 – 25 cm s vnitřním průměrem 3 – 5 mm. Jako sorbenty umístěné v kolonách se používají chemicky vázané stacionární fáze, kterými bývají silikagelová zrna, na jejichž povrchové hydroxylové skupiny jsou navázány různé radikály. Nejčastěji se můžeme setkat s navázanými uhlovodíkovými řetězci s 18 nebo 8 uhlíky. Tato fáze bývá též označována jako reverzní, jelikož se jedná o nepolární fázi. Středně polární fáze mívají navázaný tříuhlíkatý řetězec zakončený například amino skupinou nebo nitrilovou skupinou. Jako polární sorbent lze použít silikagel bez navázaných radikálů nebo oxid hlinitý. Ovšem chemicky vázané stacionární fáze se používají daleko častěji (Klimeš 2011).

Když v průběhu měření dochází k programové změně složení mobilní fáze, mluvíme o gradientové eluci, zatímco pokud složení mobilní fáze zůstává konstantní, jedná se o isokratickou eluci. Gradientová eluce poskytuje lepší výsledky (Adrey 2003).

Základní charakteristickou veličinou pro HPLC je retenční čas nebo retenční objem. Retenční čas ( $t_R$ ) představuje dobu, která uplyne od nástřiku vzorku do té chvíle, kdy se objeví maximum chromatografického píku. Objem mobilní fáze, který za tuto dobu proteče kolonou, se označuje jako retenční objem. Identifikace se provede porovnáním retenčního času vzorku a měřeného standardu. Pokud se jedná o totožnou

látku, měl by být retenční čas stejný. Pro kvantitativní měření se využívá plocha pod chromatografickým píkem, případně jeho výška (Nováková *et al.* 2013).

HPLC se skládá ze zásobníků na mobilní fáze, programovací jednotky, která určuje složení mobilní fáze. Dávkovací zařízení zajišťuje vstřik požadovaného množství vzorku. Vysokotlaké čerpadlo udržuje konstantní průtokovou rychlost mobilní fáze přes kolonu, kde dojde k separaci vzorku na jednotlivé složky. Průtok separátů je indikován prostřednictvím detekční cely diferenčního detektoru, který předává signál do počítače, kde na jeho základě vzniká patřičný chromatogram (Klimeš 2011).

Typ použitého detektoru má významný vliv na citlivost a selektivitu chromatografické analýzy. Mezi jedny z nejpoužívanějších detektorů patří například spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické nebo hmotnostně spektrometrické detektory (Nováková *et al.* 2013).

## 6.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika, při které jsou plynné ionty vzniklé z molekul nebo atomů vzorku separovány a detekovány prostřednictvím poměru jejich hmot a celkového náboje ( $m/z$ ). Takto zaznamenané hodnoty tvoří hmotnostní spektrum, kde se intenzita jednotlivých píků vyjadřuje jako procentuální hodnota nejvíce zastoupeného iontu, který je označován jako základní pík. Spektrum poskytuje relativní molekulové hmotnosti, podle kterých může být neznámá zkoumaná sloučenina identifikována a určena její struktura. Toto stanovení také závisí na produktových iontech určených pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (Kealey a Haines 2002, Watson a Sparkman 2007).

Zařízení je složeno ze vstupu pro vzorek, který usnadňuje přísun plynného a vypařujícího se tekutého vzorku přes molekulární štěrbinu nebo pevného vzorku přes vyhřívanou sondu, která byla vložena prostřednictvím vakuového zámku. Z odpařujícího se vzorku jsou pomocí iontového zdroje generovány ionty, které jsou následně separovány v závislosti na jejich  $m/z$  a detekovány hmotnostním analyzátozem. Ionty generované ve zdroji jsou urychlovány v komoře analyzátoru prostřednictvím vzrůstajícího negativního potenciálu na sérii kovových štěrbin, kterými procházejí (Kealey a Haines 2002).

### 6.2.1 Ionizační techniky

U hmotnostní spektrometrie lze použít mnoho způsobů ionizace. Ionizační techniky můžeme dělit na tvrdé a měkké. Nejběžnější tvrdou ionizační technikou je elektronová ionizace, při které dochází k ovlivnění elektromagnetických polí, čímž dojde k uvolnění valenčního elektronu, vzniku molekulárního iontu  $M^{+\bullet}$  a k rozsáhlé fragmentaci molekuly. Mezi měkké ionizační techniky patří například techniky ionizace za atmosférického tlaku, které zahrnují ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci a fotoionizaci. Další často využívanou technikou je ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI). Při použití měkkých ionizačních technik vznikají protonované molekuly  $[M-H]^+$  (v pozitivním módu) nebo deprotonované molekuly  $[M-H]^-$  (v negativním módu) a nedochází k výrazné fragmentaci jako v případě tvrdých ionizačních technik (Nováková *et al.* 2013).

ESI je jednou z nejšetrnějších technik, a proto se s výhodou používá pro analýzu makromolekul. Při ESI je důležité zajistit pomalý tok (0,1 – 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) mobilní fáze skrz kapiláru, na kterou je vloženo napětí 2 – 5 kV. V závislosti na stanovovaném analytu může toto napětí mít pozitivní i negativní hodnoty. Vložené napětí umožní vznik elektrického gradientu, který je nezbytný pro separaci jednotlivých složek na povrchu kapaliny v závislosti na neseném náboji. Výsledkem je vznik tzv. Taylorova kuželu, který je tvořen kapalinou přechýlující konec kapiláry. Když kapalina tvořící Taylorův kužel dosáhne tzv. Rayleightova limitu, což je bod, při kterém se vyrovná odpor povrchových nábojů s povrchovým napětím kapaliny, dojde k oddělování kapek analytu obsahujících nadbytek kladných nebo záporných nábojů (Cech a Enke 2001). Tyto kapky putují ke vstupu do hmotnostního spektrometru, přičemž generují ionty některým z navrhovaných mechanismů (Kearle a Peschke 1999). Jedním mechanismem je rozpad velkých kapek na menší a následně až na samotné ionty v důsledku odpařování rozpouštědla (Dole *et al.* 1968). Druhý předpokládá, že v průběhu odpařování rozpouštědla překoná odpor mezi náboji povrchové napětí kapaliny a to způsobí vznik iontů (Iribarne a Thomson, 1976).

## 6.2.2 Analyzátořy

Analyzátoř bývá umístěn mezi iontovým zdrojem a detektorem. Jeho funkce spočívá v rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  a následně jejich urychlení a fokusace. Mezi běžně používané analyzátořy patří například magnetický analyzátoř, kvadrupol, trojitý kvadrupol, iontová past, orbitální past a analyzátoř doby letu. Jednotlivé analyzátořy se od sebe liší v základních principech. Pro magnetický analyzátoř je typické zakřivení dráhy letu v magnetickém nebo elektrickém poli, případně v jejich kombinaci. V případě kvadrupolu, trojitého kvadrupolu a iontové pasti se jedná o různou stabilitu oscilací iontů ve dvojrozměrné nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Principem analyzátořu doby letu je stanovení různé doby letu iontů v oblasti bez pole. Orbitální past funguje na základě rozdělení iontů dle různé frekvence harmonických oscilací (Nováková *et al.* 2013).

V současné době jsou často používány tzv. hybridní analyzátořy, které jsou tvořeny ze dvou odlišných typů za účelem využití výhod obou analyzátořů. Příkladem může být kvadrupol-analyzátoř doby letu (micrOTOF-Q), kde kombinace analyzátořů zajišťuje vysokou přesnost měření. Analyzátoř doby letu umožňuje měření s chybou menší než 2 mDa, které poskytuje výrazné vylepšení metody, než kdyby se použil samotný kvadrupol nebo zařízení s iontovou pastí. Tento hybridní analyzátoř umožňuje získat iontové spektrum produktu s hodnotami disponujícími vysokým stupněm přesnosti, čímž snižují riziko falešně pozitivní chyby a zajišťují spolehlivou identifikaci neznámých sloučenin. Jedná se o výborný analyzátoř při studii degradace, transformace a metabolismu organických odpadních látek (Petrovic a Barceló 2006).



## ***7 CÍLE PRÁCE***

Cílem této práce bylo:

- identifikovat metabolity první a druhé fáze biotransformace MOP u ovce (*Ovis aries*) *in vivo*
- identifikovat metabolity první a druhé fáze biotransformace MOP u parazitů *H. contortus ex vivo* a porovnat biotransformaci MOP u citlivého kmene ISE a multirezistentního kmene WR
- navrhnout schéma metabolismu MOP u parazitů a u jejich hostitelů

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 8 *BIOLOGICKÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, REAGENCIE A CHEMIKÁLIE*

### 8.1 Biologický materiál

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

Byly použity dva kmeny (ISE - Inbred susceptible Edinburgh, WR - White river) *H. contortus* získané z ovcí (*Ovis aries*, kastrování samci ve stáří 3 – 4 měsíců s průměrnou hmotností 20 kg), které byly chovány na farmě Běleč (Česká republika).

Moč a trus

Vzorky moče a trusu byly získány z ovcí (*Ovis aries*, kastrování samci ve stáří 9 měsíců s průměrnou hmotností 20 kg) chovaných na farmě Běleč (Česká republika).

Veškeré experimenty byly provedeny v souladu se zákonem č. 246/1992 sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů a pod dohledem lokální Odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

### 8.2 Přístrojové vybavení

Automatické pipety Eppendorf

Centrifuga Eppendorf Centrifuge

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

Hlubokomrazicí box Thermo Scientific

Koncentrátor Eppendorf Concentrator 5301

Laminární box Bioair instruments

micrOTOF-Q Hmotnostní spektrometr Bruker Daltonics

Mythic Blood mixer 12 (roller)

pH metr Thermo Orion

Systém čištění vody Millipore – Milli - Q

UHPLC Agilent 1290 Infinity kapalinový chromatograf Agilent Technologies

Ultrazvuk Bandelin Sonorex

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls Bandelin HD 2070

Váhy ScalTec SBC 22

Vortex MS2 Minishaker

### **8.3 Reagencie a chemikálie**

4-fluor-3-trifluormethylbenzonitril, Sigma Aldrich

Acetonitril, Sigma Aldrich, LC/MS čistota

Agaróza, Serva

Amoniak, Sigma Aldrich

Benzoylchlorid, Sigma Aldrich

Dihydrogenfosforečnan sodný, Penta

Dimethylsulfoxid (DMSO), Penta

Ethanol, Sigma Aldrich

Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-*N, N, N', N'*- tetraoctová kyselina (EGTA), Sigma Aldrich

Ham F12 medium, Sigma Aldrich

Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma Aldrich

Hydrogenfosforečnan sodný, Penta

Hydroxyaceton, Sigma Aldrich

Chlorid amonný, Sigma Aldrich

Kyanid draselný, Sigma Aldrich

Kyselina octová, Penta

Methanol, Penta

Monepantel, připraven na Katedře Anorganické a Organické chemie

Octan amonný, Sigma Aldrich

Penicilin, Sigma Aldrich

Pufrovaný fyziologický roztok (PBS), Sigma Aldrich

Pyridinium *p*-toluensulfonát, Sigma Aldrich

Streptomycin, Sigma Aldrich

*tert*-butoxid draselný, Sigma Aldrich

Tetrahydrofuran, Sigma Aldrich

Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Sevapharma

Williams' medium, Sigma Aldrich

Zolvix, Novartis Animal Health

## 9 PRACOVNÍ POSTUPY

### 9.1 Příprava monepantelu

Monepantel byl připraven na Katedře Anorganické a Organické chemie (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika) podle Kaminsky *et al.* (2008a) s drobnými úpravami. Výchozí hydroxyaceton byl nejprve převeden na tetrahydropyran-2-yl (THP) ether (výtěžek 79 %). Následovala Streckerova syntéza využívající kyanid draselný, chlorid amonný a roztok amoniaku v ethanolu (výtěžek 70 %). Výsledný aminoacetonitril byl po reakci s benzoylchloridem převeden na derivát (4-trifluormethylsulfanyl) benzamidu (výtěžek 71 %). THP chránící skupina byla odštěpena v mírně kyselém prostředí (pyridinium *p*-toluensulfonát (PPTS)/methanol; výtěžek 97 %). Na závěr byla provedena nukleofilní aromatická substituce s 4-fluor-3-trifluormethylbenzonitrilem a alkoholátem, který vznikl z AAD pomocí čerstvého roztoku *tert*-butoxidu draselného (*t*-BuOK) v tetrahydrofuranu (THF) (výtěžek 27 %). Struktura a čistota připravené látky byla ověřena pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) (Stuchlíková *et al.* 2012).

### 9.2 Příprava pracovních roztoků

#### Na-fosfátový pufr (0,1 M; pH 7,4)

Rozpuštěním 17,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ( $M_r = 358,14$  g/mol) v 500 ml redestilované vody a 3,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $M_r = 156,01$  g/mol) v 250 ml redestilované vody vznikly 0,1 M zásobní roztoky, které byly smíseny v takovém poměru, aby bylo dosaženo požadované hodnoty pH.

#### Pufrovaný fyziologický roztok

Jedna tableta pro přípravu roztoku PBS byla rozpuštěna ve 200 ml redestilované vody.

#### Roztok monepantelu (10 mM)

1 mg monepantelu ( $M_r = 473$  g/mol) byl rozpuštěn ve 211  $\mu\text{l}$  DMSO.

### **Roztok octanu amonného (0,5 mM)**

38,54 mg krystalického octanu amonného ( $M_r = 77,08 \text{ g/mol}$ ) bylo rozpuštěno v 1 l redestilované vody a následně byl roztok upraven na pH 4 pomocí kyseliny octové.

## **9.3 Sběr biologického materiálu**

### **9.3.1 Sběr parazitologického materiálu**

V této studii byly použity dva kmeny *H. contortus*, citlivý kmen ISE a multirezistentní kmen WR. Kmen ISE je odvozen od kmene SE (susceptible Edinburgh) s vrozenou citlivostí na anthelmintika, který byl izolován v době, kdy ještě nebyly benzimidazoly na trhu (Roos *et al.* 2004). Kmen WR byl izolován v Jihoafrické republice a vyznačuje se rezistencí vůči ivermektinu, benzimidazolům, rafoxanidu a klosantelu (van Wyk a Malan 1988).

Šest ovcí zbavených veškerých parazitů ve stáří tří až čtyř měsíců bylo perorální cestou infikováno 5 000 larvami *H. contortus* v L<sub>3</sub>. Larvy *H. contortus* L<sub>3</sub> byly dovezeny z Parazitologického ústavu Slovenské akademie věd. Přeléčení bylo provedeno perorálně podáním dvou dávek albendazolu (30 mg/kg) v rozpětí dvou dnů. Dospělí jedinci nematod byli vyjmuti po sedmi týdnech od infekce pomocí agarové metody (obrázek 4) (van Wyk *et al.* 1980).



**Obrázek 4** Získávání nematod z agaru ulpělého na plátech gázy (foceno prof. RNDr. Jiřím Lamkou, CSc. na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové)

### ***9.3.2 Sběr exkrementů***

Pro *in vivo* studii byla použita moč a trus získaná z kastrovaných ovcí (samci o přibližné hmotnosti 20 kg, stáří 9 měsíců) chovaných na farmě Běleč. Každé ovci bylo aplikováno perorální cestou 200 mg MOP. Moč byla sbírána po 8 hod a trus po 48 hod po podání léčiva (obrázek 5). Získané vzorky byly zamraženy a uschovány v mrazících boxech při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .





**Obrázek 5** Sběr exkrementů (foceno prof. RNDr. Jiřím Lamkou, CSc. na farmě Běleč, Česká republika)

#### **9.4 Kultivace nematod a biotransformace MOP *ex vivo***

Izolovaná nematoda byla třikrát promyta Na-fosfátovým pufrům o pH 7,4. Vždy k 30 jedincům nematod bylo přidáno 5 ml RPMI média o pH 7,4, které obsahovalo 60  $\mu\text{g/ml}$  penicilinu a 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycinu. Nematoda byla kultivována 4 hod v termostatu (38 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

Po kultivaci bylo 2,5 ml média odebráno a nahrazeno 2,5 ml média, které obsahovalo MOP (20  $\mu\text{M}$ ). Vzorke byly inkubovány 24 hod v termostatu (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Současne byly připraveny dva typy slepých vzorků, chemický slepý vzorek (SLCH), který obsahoval médium s léčivem a biologický slepý vzorek (SLB), ve kterém byl přidáný MOP k nematodám nahrazen DMSO. Po inkubaci bylo odebráno médium a nematoda byla třikrát promyta PBS. Vzorke byly zamražené a uschovány v hlubokomrazících boxech při -80 °C.

## 9.5 Příprava vzorků a extrakce na pevných fázích

Nematoda byla homogenizována 6 x 10 sekund v 1 ml ledovém 0,1 M Na-fosfátovém pufru o pH 7,4 ultrazvukovým homogenizátorem. Vzorky byly centrifugovány (3 000 x g, 5 min). Následovala extrakce homogenátu a média na pevných fázích (SPE, solid-phase extraction). Pro vlastní extrakci byly použity kolonky Phenomenex Strata X (3 ml, 60 mg, 33  $\mu\text{m}$ ). SPE sorbent byl aktivován 1 ml acetonitrilu a 1 ml redestilované vody. V dalším kroku byl vzorek přečištěn 2 ml 10% (v/v) acetonitrem a eluován z kolonky 1 ml 100% acetonitrem. Vzorky byly odpařeny ve vakuovém koncentrátoru.

K 1 g trusu bylo přidáno 9 ml acetonitrilu. Po homogenizaci třecím tloučkem následovala extrakce na mechanické třepačce po dobu 10 min a centrifugace (3 000 x g, 10 min). Supernatant byl zfiltrován přes polytetrafluoroethylenový filtr (PTFE) (25 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ ) a odpařen ve vakuovém koncentrátoru.

Moč byla zfiltrována přes PTFE (25 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ ). K filtrátu byl přidán acetonitril a následně byl centrifugován (3 000 x g, 10 min). Supernatant byl znovu filtrován přes PTFE a odpařen ve vakuovém koncentrátoru.

Všechny vzorky byly skladovány a zamraženy v mrazicích boxech při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před samotným měřením byly vzorky rekonstituovány v poměru 3:7 (v/v) acetonitril:redestilovaná voda. Objem nástřiku činil u nematod, moče a trusu 2  $\mu\text{l}$ .

## 9.6 Podmínky měření

Vzorky byly měřeny v negativním módu na ultra-vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (UHPLC) Agilent 1290 Infinity kapalinový chromatograf tandemově spojeným s hmotnostním spektrometrem za použití ESI a hybridního analyzátoru micrOTOF-Q.

Měření bylo prováděno na koloně Zorbax Eclipse C18 (150 x 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ), teplota kolony  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , průtok mobilní fáze 0,3 ml/min a nástřik vzorku 2  $\mu\text{l}$ . Byla použita gradientová eluce s mobilní fází 0,5 mM octanu amonného upraveného na pH 4 (A) a acetonitrilu (B). Lineární gradient byl nastaven následovně: 0. minuta – 30 % B, 11. minuta – 95 % B, 12. minuta – 95 % B a závěrečné promytí kolony.

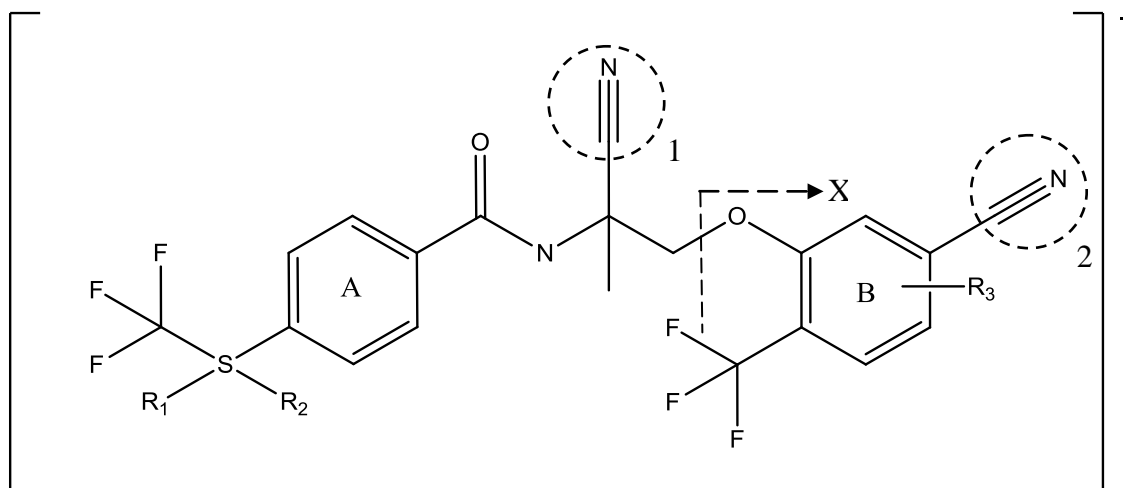
Hmotnostní spektrometr micrOTOF-Q s rozlišovací schopností vyšší než 13 000 byl použit s tímto nastavením parametrů: napětí na kapiláře 4,5 kV, teplota sušícího

plynu 220 °C, průtok a tlak dusíku 8 l/min a 1,3 bar. Před jednotlivými měřeními byla provedena externí kalibrace s klastry mravenčanu sodného. Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozpětí 50 – 1 000  $m/z$  v negativním módu. Pro MS/MS měření byla nastavena izolační šíře na 4  $\Delta m/z$  a kolizní energie na 20 eV (nalezeno jako optimální kolizní energie pro fragmentaci studovaných iontů metabolitů), jako kolizní plyn byl použit argon.

## 10 VÝSLEDKY

Biotransformace MOP byla studována u ovcí (*Ovis aries*) *in vivo* a u jejich parazitů (*H. contortus*) *ex vivo*. Při *in vivo* studii byly identifikovány metabolity první a druhé fáze biotransformace ve vzorcích moči a trusu. Moč byla sbírána po 8 hod a trus po 48 hod po podání 2,5 mg MOP/kg tělesné hmotnosti hostitele. Nematoda získaná ze slezu ovcí pomocí agarové metody (van Wyk *et al.* 1980) byla zhomogenizována a vzorky byly extrahovány pomocí SPE. Společně se vzorky homogenátu nematod byly připraveny i vzorky kultivačního média.

Hmotnostní spektrum deprotonované molekuly parentní látky, MOP, je detekováno při  $m/z$  472  $[M-H]^-$  (retenční čas 8,43 min). Při MS/MS fragmentaci došlo při dodání kolizní energie 20 eV k charakteristickému štěpení a ke vzniku produktového iontu  $m/z$  186  $[M-H]^-$ , které je společně s chemickou strukturou MOP, N-[(1S)-1-kyano-2-(5-kyano-2-trifluoromethylfenoxy)-1-methyl-ethyl]-4-trifluoromethylsulfanylbenz-amidu, uvedeno na obrázku 6.



**Obrázek 6** Chemická struktura MOP, jeho metabolitů, produktových iontů a označení míst pro první a druhou fázi biotransformace a štěpení vazby při MS/MS fragmentaci jednotlivých metabolitů

$R_1, R_2, R_3$  substituenty (viz tabulka 1)

A, B označení aromatických kruhů

1, 2 označení nitrilových skupin

---> štěpení vazby

X klíčový fragment

Klíčové fragmenty metabolitů jsou shrnuty v tabulce 1. Metabolity stanovené při *in vivo* studii jsou zobrazeny na obrázku 7 a metabolity identifikované při *ex vivo* studii na obrázku 8. V tabulce 3 jsou uvedeny  $t_R$ , teoretické  $m/z$  hodnoty  $[M-H]^-$  iontů, molekulové hmotnosti (MW), elementární složení a produktové ionty.

Veškerá měření byla provedena v negativním ESI módu, protože vykazoval lepší senzitivitu pro studované metabolity než pozitivní mód. Experimentální hodnoty  $[M-H]^-$  iontů se od teoretických lišily o méně než 3 ppm. Poměr signál/šum (S/N) byl vyšší než 5 pro všechny metabolity.

**Tabulka 1** Metabolity první a druhé fáze biotransformace MOP, jejich substituenty a klíčové fragmenty

Metabolit	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Hydrolýza nitrilové sk. 1 na amidovou sk.	Hydrolýza nitrilové sk. 2 na amidovou sk.	Klíčový fragment [M-H] <sup>-</sup> , m/z
MOP	-	-	-	ne	ne	186
MOP.SO	O	-	-	ne	ne	186
MOP.SO <sub>2</sub>	O	O	-	ne	ne	186
MOP.C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>	-	-	-	ano	ne	186
MOP.C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	-	-	-	ne	ano	204
MOP.SO.C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	O	-	-	ne	ano	204
MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>	O	O	-	ano	ne	186
MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	O	O	-	ne	ano	204
MOP.SO <sub>2</sub> .OH	O	O	OH	ne	ne	202
MOP.SO.OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	O	-	OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	ne	ne	378
MOP.SO <sub>2</sub> .OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	O	O	OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	ne	ne	378
MOP.SO.SC <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	O	-	SC <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	ne	ne	347
MOP.SO <sub>2</sub> .SC <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	O	O	SC <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	ne	ne	347

## 10.1 Metabolity první fáze biotransformace MOP

### 10.1.1 Studie u ovce *in vivo*

Z první fáze biotransformace byly pozorovány reakce: S-oxidace, hydroxylace, hydrolyza nitrilové skupiny na amidovou skupinu a jejich kombinace. Po perorálním podání jednorázové dávky léčiva, bylo identifikováno 5 metabolitů v moči a 7 metabolitů první fáze biotransformace v trusu.

Monepantel sulfoxid (MOP.SO) byl detekován v negativním módu při  $m/z$  488 [M-H]<sup>-</sup>. Po druhé S-oxidaci se přeměnil na monepantel sulfon (MOP.SO<sub>2</sub>)  $m/z$  504 [M-H]<sup>-</sup>. MOP.SO<sub>2</sub> je hlavním metabolitem v metabolismu MOP. Ve stanovovaných vzorcích byl nalezen ve významně vyšším množství než ostatní metabolity (tabulka 2). Tento metabolit dále podléhal hydroxylaci, která probíhala na aromatickém kruhu B za vzniku hydroxylovaného monepantel sulfonu (MOP.SO<sub>2</sub>.OH)  $m/z$  520 [M-H]<sup>-</sup>. Byla identifikována přítomnost dvou strukturních izomerů, které měly podobné MS/MS spektrum (tabulka 3). Strukturní izomery nelze odlišit, protože hmotnostní spektrometrie nedokáže určit pozici hydroxylové skupiny na aromatickém kruhu (Nobilis *et al.* 1996). Všechny výše zmiňované metabolity první fáze biotransformace (MOP.SO, MOP.SO<sub>2</sub>, MOP.SO<sub>2</sub>.OH) byly stanoveny jak v moči, tak i v trusu.

Pro všechny metabolity, u kterých nedošlo k metabolickému kroku na aromatickém kruhu B (MOP.SO, MOP.SO<sub>2</sub>), byl identifikován produktový iont  $m/z$  186 [M-H]<sup>-</sup>, který vznikl charakteristickým štěpením jako parentní látka (obrázek 6). Hydroxylace na aromatickém kruhu B byla identifikována na základě vzniku klíčového fragmentu  $m/z$  202 [M-H]<sup>-</sup>, který se liší od charakteristického fragmentu  $m/z$  186 [M-H]<sup>-</sup> o jeden kyslík. Často pozorovanou neutrální ztrátou je odštěpení fluorovodíku ( $\Delta m/z$  20) z aromatického kruhu B. U metabolitů MOP.SO a MOP.SO<sub>2</sub> došlo ke vzniku iontu  $m/z$  166 [186-HF]<sup>-</sup> a u MOP.SO<sub>2</sub>.OH ke vzniku  $m/z$  182 [202-HF]<sup>-</sup>. V případě MOP.SO došlo i ke ztrátě dvou molekul fluorovodíku a ke vzniku  $m/z$  146 [166-HF]<sup>-</sup>. U metabolitu MOP.SO<sub>2</sub>.OH byla detekována ztráta kyanovodíku ( $\Delta m/z$  27), která se projevila vznikem produktového iontu  $m/z$  493 [520-HCN]<sup>-</sup>.

**Tabulka 2** Semikvantitativní stanovení MOP a jeho metabolitů, Hmg. = homogenát nematod

$t_R$ [min]	MW	Zkratka metabolitu	Plocha píku					
			Moč	Trus	ISE		WR	
					Hmg.	Médium	Hmg.	Médium
3.48	697	MOP.SO <sub>2</sub> .OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	2791	-	-	-	-	-
3.58	681	MOP.SO.OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	2610	-	-	-	-	-
4.24	650	MOP.SO.SC <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	2789	-	-	-	-	-
4.41	697	MOP.SO <sub>2</sub> .OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	1255	-	-	-	-	-
4.81	507	MOP.SO.C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	2225	-	-	-	-	-
5.15	666	MOP.SO <sub>2</sub> .SC <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	3964	594	-	-	-	-
5.96	523	MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	-	5249	-	-	-	-
6.40	523	MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>	-	670	-	-	-	-
6.51	491	MOP. C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	-	3257	948	-	649	443
6.66	521	MOP.SO <sub>2</sub> .OH	790	5962	-	-	-	-
6.81	489	MOP.SO	51759	5675	11456	-	28235	1603
6.90	521	MOP.SO <sub>2</sub> .OH	1892	1354	-	-	-	-
7.03	491	MOP. C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>	-	-	544	-	537	-
7.81	505	MOP.SO <sub>2</sub>	45582	647466	-	-	6101	-
8.43	473	MOP	8663	389259	2623676	41496	1876902	1053914

Dalším metabolickým krokem první fáze biotransformace je hydrolyza nitrilové skupiny na amidovou skupinu. Ta může probíhat na dvou místech molekuly, na nitrilové skupině 1 umístěné na alifatickém uhlíku a na nitrilové skupině 2 umístěné na aromatickém kruhu B (obrázek 6). V moči byl nalezen monepantel sulfoxid s hydrolyzou nitrilové skupiny 2 (MOP.SO.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>)  $m/z$  506 [M-H]<sup>-</sup>. V trusu byly detekovány tři metabolity, u kterých proběhla hydrolyza nitrilových skupin. Patří mezi ně monepantel s hydrolyzou nitrilové skupiny 2 (MOP.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>)  $m/z$  490 [M-H]<sup>-</sup>, monepantel sulfon s hydrolyzou nitrilové skupiny 1 (MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub>)  $m/z$  522 [M-H]<sup>-</sup> a monepantel sulfon s hydrolyzou nitrilové skupiny 2 (MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>)  $m/z$  522 [M-H]<sup>-</sup>.

U metabolitu  $\text{MOP.SO}_2.\text{C}^1\text{ONH}_2$  s hydrolyzou nitrilové skupiny 1 byl detekován produktový iont  $m/z$  186  $[\text{M-H}]^-$ , který vznikl charakteristickým štěpením jako parentní látka (obrázek 6). U ostatních metabolitů ( $\text{MOP.C}^2\text{ONH}_2$ ,  $\text{MOP.SO.C}^2\text{ONH}_2$ ,  $\text{MOP.SO}_2.\text{C}^2\text{ONH}_2$ ), kde probíhala hydrolyza na nitrilové skupině 2, byl detekován stejný produktový iont  $m/z$  204  $[\text{M-H}]^-$ . U  $\text{MOP.C}^2\text{ONH}_2$  a  $\text{MOP.SO}_2.\text{C}^2\text{ONH}_2$  byla pozorována charakteristická ztráta fluorovodíku ( $\Delta m/z$  20) z aromatického kruhu B za vzniku produktového iontu  $m/z$  184  $[\text{204-HF}]^-$ .

### **10.1.2 Studie u *H. contortus ex vivo***

Ve studii *ex vivo* byly zkoumány vzorky homogenátu nematod a kultivačního média kmenů WR a ISE. Byly identifikovány 4 metabolity první fáze biotransformace vzniklé S-oxidací a hydrolyzou nitrilové skupiny na amidovou skupinu, která byla pozorována u obou nitrilových skupin molekuly. Byla zjištěna přítomnost metabolitů  $\text{MOP.SO}$   $m/z$  488  $[\text{M-H}]^-$ ,  $\text{MOP.SO}_2$   $m/z$  504  $[\text{M-H}]^-$  a produktů hydrolyzy  $\text{MOP.C}^1\text{ONH}_2$   $m/z$  490  $[\text{M-H}]^-$  a  $\text{MOP.C}^2\text{ONH}_2$   $m/z$  490  $[\text{M-H}]^-$ . Všechny metabolity, s výjimkou  $\text{MOP.C}^1\text{ONH}_2$ , byly stanoveny ve studii *in vivo* a jejich produktové ionty byly totožné. V případě  $\text{MOP.C}^1\text{ONH}_2$  vznikl charakteristický produktový iont  $m/z$  186  $[\text{M-H}]^-$  stejně jako u parentní látky.

## **10.2 Metabolity druhé fáze biotransformace MOP**

### **10.2.1 Studie u ovce *in vivo***

Při studii *in vivo* bylo detekováno 5 metabolitů druhé fáze biotransformace MOP v moči a 1 v trusu. Glukuronid monepantel sulfoxidu ( $\text{MOP.SO.OC}_6\text{H}_9\text{O}_6$ ) byl identifikován při  $m/z$  680  $[\text{M-H}]^-$  a dva strukturální izomery glukuronid monepantel sulfonu ( $\text{MOP.SO}_2.\text{OC}_6\text{H}_9\text{O}_6$ ) při  $m/z$  696  $[\text{M-H}]^-$ , které se liší polohou substituentu na aromatickém kruhu B. Všechny stanovené glukuronidy byly nalezeny pouze v moči.

U glukuronidů byla identifikována charakteristická neutrální ztráta anhydroglukuronové kyseliny ( $\Delta m/z$  176). To vedlo v případě  $\text{MOP.SO}_2.\text{OC}_6\text{H}_9\text{O}_6$  ke vzniku produktového iontu  $m/z$  520  $[\text{696-C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^-$  a  $m/z$  202  $[\text{378-C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^-$ . Neutrální ztrátou fluorovodíku ( $\Delta m/z$  20) vznikl  $m/z$  358  $[\text{378-HF}]^-$ .



Dalšími metabolity druhé fáze biotransformace byly konjugáty s acetylcysteinem. Acetylcystein monopantel sulfoxid ( $\text{MOP.SO.SC}_5\text{H}_8\text{NO}_3$ ) byl detekován při  $m/z$  649  $[\text{M-H}]^-$  a acetylcystein monopantel sulfon ( $\text{MOP.SO}_2.\text{SC}_5\text{H}_8\text{NO}_3$ ) při  $m/z$  665  $[\text{M-H}]^-$ . Zatímco v moči byly identifikovány oba metabolity, v trusu byl detekován pouze  $\text{MOP.SO}_2.\text{SC}_5\text{H}_8\text{NO}_3$ . Charakteristickým štěpením vazby (obrázek 6) vznikl u obou metabolitů klíčový fragment  $m/z$  347  $[\text{M-H}]^-$ . Konjugáty s acetylcysteinem vykazují charakteristickou ztrátu substituentu z aromatického kruhu B za vzniku produktového iontu  $m/z$  186  $[\text{347-SC}_5\text{H}_8\text{NO}_3]^-$ . U metabolitu  $\text{MOP.SO}_2.\text{SC}_5\text{H}_8\text{NO}_3$  byla navíc pozorována ztráta kyanovodíku ( $\Delta m/z$  27) za vzniku produktového iontu  $m/z$  638  $[\text{665-HCN}]^-$ .

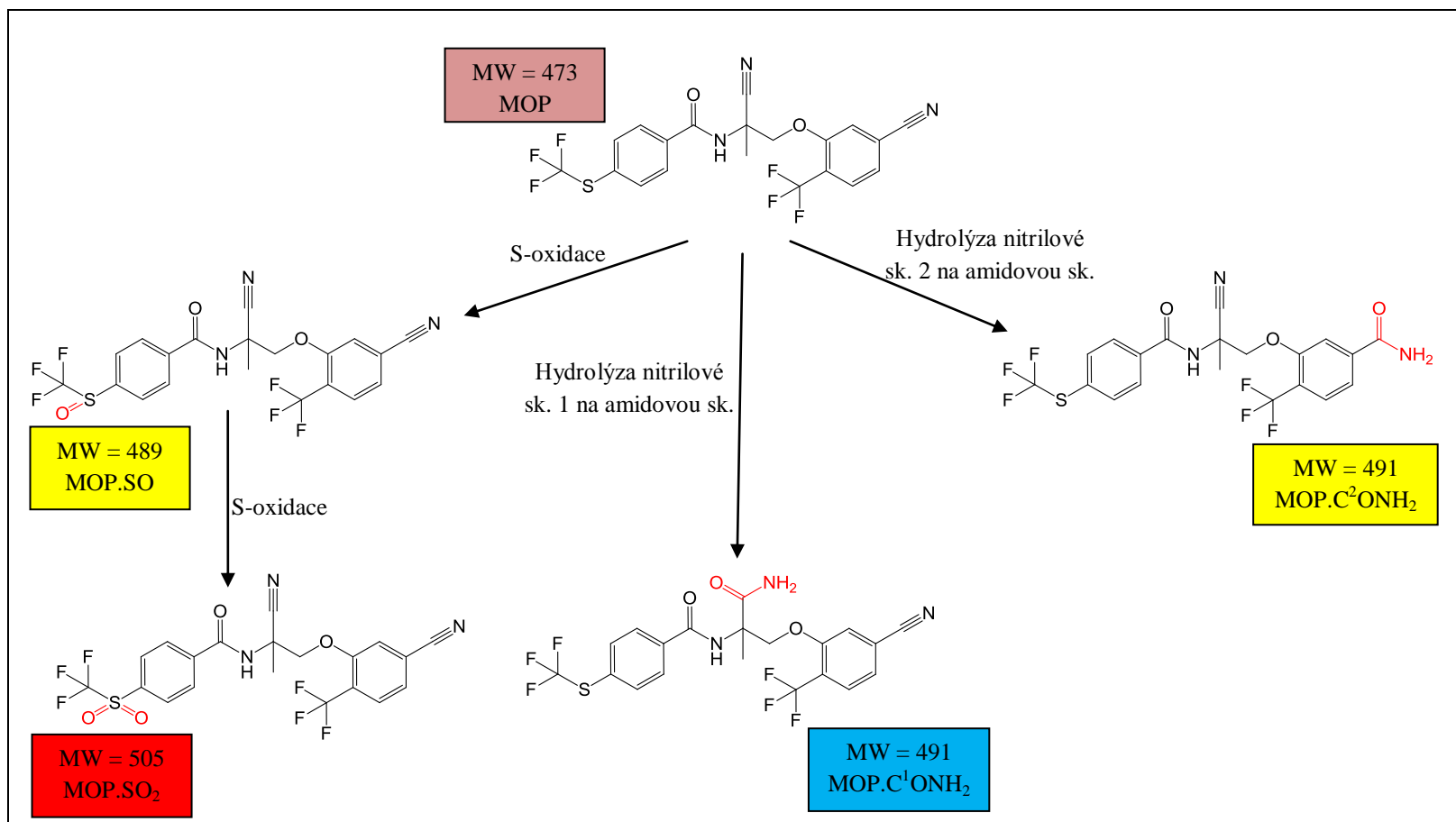
### ***10.2.2 Studie u *H. contortus* ex vivo***

Při studii *ex vivo* nebyl stanoven žádný metabolit druhé fáze biotransformace.

**Tabulka 3** Seznam metabolitů MOP identifikovaných UHPLC/MS/MS,  $t_R$ , teoretické  $m/z$  hodnoty  $[M-H]^-$  iontů, MW, elementární složení a produktové ionty

$t_R$ [min]	Teoretické $m/z$ hodnoty [M-H] <sup>-</sup> iontů	MW	Elementární složení	Fáze biotransformace		Produktový iont, $m/z$	Vzorek	Zkratka
				1. fáze	2. fáze			
3.48	696.0728	697	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub> S	2*S-oxidace, hydroxylace	Glukuronidace	520; 358; 202	moč	MOP.SO <sub>2</sub> .OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>
3.58	680.0779	681	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	S-oxidace, hydroxylace	Glukuronidace	-	moč	MOP.SO.OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>
4.24	649.0656	650	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	S-oxidace, hydroxylace	Konjugace s acetylcysteinem	347; 186	moč	MOP.SO.SC <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>
4.41	696.0728	697	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub> S	2*S-oxidace, hydroxylace	Glukuronidace	-	moč	MOP.SO <sub>2</sub> .OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>
4.81	506.0615	507	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	S-oxidace, hydrolyza nitrilové sk. 2 na amidovou sk.	-	204	moč	MOP.SO.C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>
5.15	665.0605	666	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	2*S-oxidace, hydroxylace	Konjugace s acetylcysteinem	638; 347; 186	moč, trus	MOP.SO <sub>2</sub> .SC <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>
5.96	522.0564	523	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	2*S-oxidace, hydrolyza nitrilové sk. 2 na amidovou sk.	-	204; 184	trus	MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>
6.40	522.0564	523	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	2*S-oxidace, hydrolyza nitrilové sk. 1 na amidovou sk.	-	186	trus	MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>
6.51	490.0666	491	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	Hydrolyza nitrilové sk. 2 na amidovou sk.	-	204; 184	trus, ISE a WR homogenát, WR médium	MOP.C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>
6.66	520.0407	521	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	2*S-oxidace, hydroxylace	-	493; 202	moč, trus	MOP.SO <sub>2</sub> .OH
6.81	488.0509	489	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	S-oxidace	-	186; 166; 146	moč, trus, ISE a WR homogenát, WR médium	MOP.SO
6.90	520.0407	521	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	2*S-oxidace, hydroxylace	-	493; 202; 182	moč, trus	MOP.SO <sub>2</sub> .OH
7.03	490.0666	491	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	Hydrolyza nitrilové sk. 1 na amidovou sk.	-	186	ISE a WR homogenát	MOP.C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>
7.81	504.0458	505	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	2*S-oxidace	-	186; 166	moč, trus, WR homogenát	MOP.SO <sub>2</sub>
8.43	472.0560	473	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	parentní látka	-	186	všechny vzorky	MOP





**Obrázek 8** Schéma biotransformace MOP u parazita *H. contortus* prostřednictvím studie *ex vivo* (■ stanoveno v homogenátu WR, ■ stanoveno v homogenátu WR a ISE, ■ stanoveno v homogenátu WR a ISE a v kulturačním médiu WR, ■ parentní látka)

## 11 DISKUZE

Helmintózy v dnešní době představují významnou hrozbu, která je schopna napáchat výrazné ekonomické škody. To je především způsobeno snížením citlivosti na současně používané skupiny léčiv a vývojem multirezistentních kmenů (Taylor *et al.* 2002). Na běžně používaná širokospektrá anthelmintika z řad makrocyklických laktonů, benzimidazolů a imidazothiazolů se stále častěji vyskytují rezistence, a proto je potřeba rozšířit farmakoterapii o další účinné a bezpečné látky s odlišným mechanismem účinku (Kaminsky *et al.* 2008a).

Vhodným kandidátem je amino-acetonitrilový derivát MOP, který vykazuje vysokou účinnost proti všem gastrointestinálním nematodám, včetně rezistentních kmenů (Kaminsky *et al.* 2008a), a nízkou toxicitu u hlodavců, ovcí a hovězího dobytka (Kaminsky *et al.* 2008b). MOP je chirální látka, přičemž anthelmintickou aktivitu vykazuje pouze S-enantiomer (Ducray *et al.* 2008). Doporučená dávka účinná proti všem hlavním gastrointestinálním nematodám, včetně kmenů rezistentních na benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyklické laktony a kombinaci derquantelu a abamektinu, je 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti (Bustamante *et al.* 2009, Hosking *et al.* 2010, Kaminsky *et al.* 2009, Kaminsky *et al.* 2011, Sager *et al.* 2009). V současné době se MOP prodává pod komerčním názvem Zolvix<sup>®</sup> například ve Francii, Velké Británii, Austrálii, Novém Zélandu, Německu, Švýcarsku (Kaminsky a Rufener 2012).

Ačkoli se MOP používá ve veterinární praxi již několik let, nebyl dosud popsán jeho metabolismus ani u cílových zvířat *in vivo* (hlavně ovce), ani u nematod. Jediným dříve nalezeným metabolitem MOP je MOP-sulfon, který je hlavním MOP metabolitem v plasmě ovcí (Karadzovska *et al.* 2009, Kinsella *et al.* 2011). Proto bylo cílem našeho projektu doplnit tyto informace studií metabolismu MOP u ovce *in vivo* a u *H. contortus ex vivo*.

S tímto cílem byla ovčím podána terapeutická dávka MOP a vzorky moči byly sbírány po 8 hod a trus po 48 hod po podání MOP. Dospělci *H. contortus* byli získáni ze slezu infikovaných ovcí pomocí agarové metody (van Wyk *et al.* 1980) a inkubovány *ex vivo* v kultivačním médiu s MOP po 24 hod. Vzorky nematod byly připraveny jejich homogenizací a pomocí SPE.

UHPLC-MS měření MOP a jeho metabolitů bylo prováděno v negativním ESI módu, protože vykazuje vyšší senzitivitu pro studované metabolity. Například stanovení

MOP.SO<sub>2</sub> v negativním módu dosahovalo až třicetkrát a MOP více než dvakrát vyšší intenzity než v pozitivním módu. Příčinou vyšší senzitivity v negativním módu je přítomnost dvou bazických skupin (amino a aryloxy skupina) a žádné kyselé skupiny. Na základě této skutečnosti se předpokládá vznik negativního náboje na bazickém dusíku (Kinsella *et al.* 2011). ESI je jednou z měkkých ionizačních technik a je metodou volby pro polární i iontové sloučeniny. Další výhodou oproti jiným metodám při stanovování metabolitů je schopnost měkké ionizace produktů druhé fáze biotransformace (Holčapek *et al.* 2008). Použitý hybridní analyzátor micrOTOF-Q je díky své vysoké přesnosti jedním z nejvíce používaných analyzátorů při identifikaci produktů metabolismu (Holčapek *et al.* 2008, Petrovic a Barceló 2006).

Při *in vivo* studii metabolismu MOP u ovce bylo identifikováno z první fáze biotransformace 5 metabolitů v moči a 7 metabolitů v trusu. V první fázi biotransformace xenobiotik často dochází k zavádění nových funkčních skupin do struktury pomocí oxidace, redukce nebo hydrolýzy, čímž se zvýší polarita molekuly a tím i její hydrofilita (Cvilink *et al.* 2009). V případě molekuly MOP byla zaznamenána S-oxidace, hydroxylace, hydrolýza nitrilové skupiny na amidovou skupinu a jejich kombinace.

S-oxidace byla předpokládanou metabolickou reakcí MOP, při které vzniká nejprve MOP.SO, který dále podléhá další S-oxidaci za vzniku hlavního produktu biotransformace u ovcí, MOP.SO<sub>2</sub>. Tento metabolit vykazuje téměř stejnou anthelmintickou aktivitu jako MOP (Karadzovska *et al.* 2009). MOP.SO<sub>2</sub> byl zmiňován už ve více studiích, které se například zabývaly kvantifikací MOP a MOP.SO<sub>2</sub> v mléku a svazech (Kinsella *et al.* 2011), identifikací metabolismu MOP v ovčích hepatocytech pomocí studie *in vitro* (Stuchlíková *et al.* 2012) a farmakokinetikou MOP a MOP.SO<sub>2</sub> u ovcí po intravenózním a perorálním podání (Karadzovska *et al.* 2009).

Hydroxylace molekuly MOP.SO<sub>2</sub> proběhla na aromatickém kruhu B, což bylo prokázáno přítomností klíčového fragmentu *m/z* 202 [M-H]<sup>-</sup>, mechanismem popsaným například Di Gennaro *et al.* (2011). Hydroxylace aromatického kruhu B MOP byla zjištěna i ve studii *in vitro* (Stuchlíková *et al.* 2012). Tímto způsobem vznikly dvě izomerní struktury MOP.SO<sub>2</sub>.OH lišící se pozicí hydroxylové skupiny, jejíž polohu není možné rozlišit pomocí hmotnostní spektrometrie.

Enzymy z nadrodiny CYP450 jsou hlavními enzymy, které by mohly katalyzovat hydroxylaci aromatického kruhu a společně s FMO být odpovědné i za S-oxidaci molekuly (Parkinson *et al.* 2001).

Hydrolyza probíhá na obou nitrilových skupinách (1 i 2), což bylo dokázáno na základě stanovení klíčových fragmentů. Pro hydrolyzu nitrilové skupiny 1 je klíčovým fragmentem  $m/z$  186 [M-H]<sup>-</sup>, zatímco pro hydrolyzu nitrilové skupiny 2  $m/z$  204 [M-H]<sup>-</sup>. Při *in vivo* studii byly celkem stanoveny čtyři produkty hydrolyzy. MOP.SO.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub> byl nalezen pouze v moči a MOP.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub> pouze v trusu. Enzymem katalyzujícím hydrolyzu nitrilových skupin by mohla být nitrilhydratáza nebo v některých případech i nitriláza (Fernandes *et al.* 2006).

Při studii metabolismu MOP u *H. contortus ex vivo* byly identifikovány metabolity v homogenátech citlivých (ISE) a multirezistentních (WR) kmenů nematod a v jejich kultivačních médiích. U *H. contortus* byly detekovány 4 metabolity první fáze biotransformace MOP (MOP.SO, MOP.SO<sub>2</sub>, MOP.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>). V homogenátu WR byly nalezeny všechny 4 metabolity, z nichž MOP.SO a MOP.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub> se nacházely i v kultivačním médiu WR. V homogenátu ISE byly stanoveny MOP.SO, MOP.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub> a MOP.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>. V kultivačním médiu ISE nebyly přítomny žádné metabolity. Všechny identifikované metabolity v *ex vivo* studii byly nalezeny i u ovce ve studii *in vivo* s výjimkou MOP.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub>, který byl stanoven pouze v ISE a WR homogenátech.

U *H. contortus* v případě MOP nebyla pozorována redukce karbonylové skupiny, což by mohlo být způsobeno stabilizací této skupiny přítomností peptidové vazby a nitrilové skupiny (Stuchlíková *et al.* 2012). Redukce karbonylové skupiny je jednou z častých biotransformačních reakcí nematod a byla zaznamenána i u *H. contortus* při metabolismu například flubendazolu (Cvilink *et al.* 2008). Redukce karbonylové skupiny je obecně považována za deaktivující cestu, kterou se organismus brání toxickému účinku reaktivních aldehydů nebo ketonů. Tento děj byl dokázán v případě redukce karbonylové skupiny mebendazolu, který následně nevykazoval žádnou anthelmintickou aktivitu (Dayan 2003, Prieto *et al.* 1991).

Studie druhé fáze metabolismu MOP u ovce *in vivo* prokázala přítomnost 5 MOP konjugátů ze skupiny glukuronidů a konjugátů s acetylcysteinem.

Glukuronidace je hlavní reakce při biotransformaci xenobiotik u savců s výjimkou rodu kočkovitých (*Felidae sp.*) (Tukey a Strassburg 2000). Touto reakcí vznikly MOP.SO.OC<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub> a dvě izomerní struktury MOP.SO<sub>2</sub>.OC<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>, kde stejně jako v případě MOP.SO<sub>2</sub>.OH není možné určit polohu substituentu pomocí hmotnostní spektrometrie. Enzymem katalyzujícím tuto konjugační reakci (obrázek 2) je UGT a pro

její průběh je nezbytná přítomnost kofaktoru UDP-GA. UDP-GA je endogenní makroergní sloučenina, která vzniká oxidací UDP-glukózy za přítomnosti oxidovaného nikotinadenindinukleotidu ( $\text{NAD}^+$ ) pomocí enzymu UDP-glukózadehydrogenázy (Skálová a Boušová 2011). Glukuronidací dojde k výraznému zvýšení hydrofility a ve většině případů i ke snížení toxicity a biologické aktivity molekuly. Z organismu jsou vylučovány v závislosti na své molekulové hmotnosti močí nebo žlučí (Skálová a Boušová 2011, Parkinson 2001).

Konjugace s glutathionem patří mezi nejvýznamnější konjugační reakce. V případě helmintů se jedná o nejčastěji pozorovanou reakci z druhé fáze biotransformace (Cvilink *et al.* 2009). Pro její průběh je nezbytná přítomnost kofaktoru GSH. Tento endogenní tripeptid se skládá z glutamátu, cysteinu a glycinu. Průběh reakce bývá urychlován prostřednictvím GST. Přítomnost toho enzymu není nezbytná, jelikož konjugace s GSH může probíhat i spontánně, což je nejspíš umožněno vysokou intracelulární koncentrací GSH. Stejně jako v případě glukuronidace vykazují konjugáty s GSH vyšší rozpustnost ve vodě a nižší toxicitu a biologickou aktivitu než původní látka. Tyto konjugáty bývají nejčastěji z organismu vylučovány žlučí nebo jsou dále, procesem hydrolýzy a následnou N-acetylací, přeměňovány na deriváty merkapturové kyseliny (acetylcystein) (obrázek 3) a vyloučeny močí (Skálová a Boušová 2011). Tímto způsobem nejspíš došlo ke vzniku metabolitů  $\text{MOP.SO.SC}_5\text{H}_8\text{NO}_3$  a  $\text{MOP.SO}_2.\text{SC}_5\text{H}_8\text{NO}_3$ .

Při *ex vivo* studii metabolismu MOP u *H. contortus* nebyl nalezen žádný metabolit druhé fáze biotransformace.

Celkově bylo u ovce v moči identifikováno 10 metabolitů MOP a v trusu 8 metabolitů MOP. V homogenátu nematod WR byly nalezeny 4 metabolity MOP vzniklé při *ex vivo* studii, z nichž se 2 nacházely i v kultivačním médiu. V homogenátu nematod ISE byly nalezeny pouze 3 metabolity MOP a v kultivačním médiu nebyl detegován žádný.

Produkty S-oxidace (MOP.SO a MOP.SO<sub>2</sub>) byly už zmiňovány v několika studiích (Karadzovska *et al.* 2009, Kinsella *et al.* 2011, Stuchlíková *et al.* 2012). Identifikace metabolitů MOP.SO<sub>2</sub>.OH, MOP.SO<sub>2</sub>.OC<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub> a MOP.SO<sub>2</sub>.SC<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>3</sub> byla stejně jako v této studii popsána i v publikaci Stuchlíková *et al.* (2012), kde byly dále stanoveny i další metabolity (hydroxylovaný monepantel, hydroxylovaný monepantel sulfon, glukuronid monepantel sulfon s hydroxylací na aromatickém kruhu B a sulfát monepantel sulfon), které v této studii nebyly nalezeny.



MOP.SO.OCC<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>, MOP.SO.SCC<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>3</sub> a všechny produkty hydrolyzy nitrilových skupin (MOP.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.SO.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub> a MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>) zatím nebyly popsány v žádné jiné studii.

## 12 ZÁVĚR

- Při *in vivo* studii metabolismu MOP u ovce bylo identifikováno celkem 10 metabolitů MOP v moči a 8 metabolitů MOP v trusu. Z toho bylo 5 konjugátů MOP (glukuronidů a konjugátů s acetylcysteinem).
- Při *ex vivo* studii metabolismu MOP u *H. contortus* byly v homogenátu nematod multiresistentního kmene WR nalezeny 4 metabolity MOP, z nichž se 2 nacházely i v kultivačním médiu. V homogenátu nematod citlivého kmene ISE byly nalezeny pouze 3 metabolity MOP a v kultivačním médiu nebyl detegován žádný. U *H. contortus* nebyl nalezen žádný metabolit druhé fáze biotransformace MOP.
- Na základě získaných výsledků bylo navrženo schéma metabolismu MOP u ovce a u *H. contortus*.
- Sedm metabolitů MOP (MOP.SO.O<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>, MOP.SO.SC<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>3</sub>, MOP.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.SO.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>, MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>1</sup>ONH<sub>2</sub> a MOP.SO<sub>2</sub>.C<sup>2</sup>ONH<sub>2</sub>) nebylo popsáno v předešlých, již publikovaných, studiích. Poprvé byla u MOP zaznamenána hydrolýza nitrilové skupiny na amidovou skupinu jako reakce první fáze biotransformace.

### ***13 SEZNAM ZKRATEK***

AAD	amino-acetonitrilové deriváty
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CoA	koenzym A
CYP450	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)- <i>N, N, N', N'</i> -tetraoctová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
FMO	flavinová monooxygenáza
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferáza
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
Hmg.	homogenát nematod
ISE	Inbred susceptible Edinburgh
L <sub>1</sub> – L <sub>5</sub>	první až páté larvální stadium
LC/MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
MALDI	ionizace desorpce laserem za účasti matrice
[M-H] <sup>-/+</sup>	de/protonovaná molekula
micrOTOF-Q	kvadrupol-analyzátor doby letu
MOP	monepantel
MOP.C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>	monepantel s hydrolyzovanou nitrilovou skupinou 1 na amidovou skupinu
MOP.C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	monepantel s hydrolyzovanou nitrilovou skupinou 2 na amidovou skupinu
MOP.OH	hydroxylovaný monepantel
MOP.SO	monepantel sulfoxid

MOP.SO.C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	monepantel sulfoxid s hydrolyzovanou nitrilovou skupinou 2 na amidovou skupinu
MOP.SO.OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	glukuronid monepantel sulfoxid
MOP.SO.SC <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	acetylcystein monepantel sulfoxid
MOP.SO <sub>2</sub>	monepantel sulfon
MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>1</sup> ONH <sub>2</sub>	monepantel sulfon s hydrolyzovanou nitrilovou skupinou 1 na amidovou skupinu
MOP.SO <sub>2</sub> .C <sup>2</sup> ONH <sub>2</sub>	monepantel sulfon s hydrolyzovanou nitrilovou skupinou 2 na amidovou skupinu
MOP.SO <sub>2</sub> .OC <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	glukuronid monepantel sulfon
MOP.SO <sub>2</sub> .OH	hydroxylovaný monepantel sulfon
MOP.SO <sub>2</sub> .SC <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	acetylcystein monepantel sulfon
Mr	relativní molekulová hmotnost
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MW	molekulová hmotnost
<i>m/z</i>	poměr hmoty a celkového náboje
NAD <sup>+</sup>	oxidovaný nikotinadeninukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluensulfonát
PTFE	polytetrafluorethylenový filtr
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SE	susceptible Edinburgh
Sk.	skupina
SLB	slepý biologický vzorek
SLCH	slepý chemický vzorek
S/N	poměr signálu a šumu
SPE	extrakce na pevných fázích
<i>t</i> -BuOK	<i>tert</i> -butoxid draselný
<i>t<sub>r</sub></i>	retenční čas
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza

UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
UHPLC/MS	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
UHPLC/MS/MS	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
WR	White river

## ***14 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY***

Adrey E. A. (2003) *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*. 1st ed. Wiley, Cornwall, ISBN 0471-49801-7.

Almeida F. A., Garcia K. C. O. D., Torgerson P. R., Amarante A. F. T. (2010) Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol. Int.* 59:622-625.

Alvarez L. I., Solana H. D., Mottier M. L., Virkel G. L., Fairweather I., Lanusse C. E. (2005) Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology* 131:501-510.

Asano Y., Tani Y., Yamada H. (1980) A new enzyme 'nitrile hydratase' which degrades acetonitrile in combination with amidase. *Agric. Biol. Chem.* 44:2251-2252.

Bain R. K. (1999). Irradiated vaccines for helminth control in livestock. *Int. J. Parasitol.* 29:185-191.

Balic A., Bowles V. M., Meeusen E. N. (2002) Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol.* 24:39-46.

Bodeček Š., Koudela B. *Veterinární a chovatelská opatření proti vnitřním parazitům u koní* [online]. Poslední revize 11.2010. [cit. 2014-02-28]. Dostupné z [http://cehis.cz/publik\\_syst/files11/Veterinari%20a%20chovatelska%20opatreni%20p%20roti%20vnitrnim%20parazitum%20u%20koni.pdf](http://cehis.cz/publik_syst/files11/Veterinari%20a%20chovatelska%20opatreni%20p%20roti%20vnitrnim%20parazitum%20u%20koni.pdf).

Bustamante M., Steffan P. E., Morlán J. B., Echevarria F., Fiel C. A., Cardozo H., Castells D., Hosking B. C. (2009) The efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against gastrointestinal nematodes of sheep in three countries of southern Latin America. *Parasitol. Res.* 106:139-144.

Callinan A. P. L., Morley F. H. W., Arundel J. H., White D. H. (1982) A model of the life cycle of sheep nematodes and the epidemiology of nematodiasis in sheep. *Agr. Syst.* 9:199-225.

Cech N. B., Enke C. G. (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass. Spectrom. Rev.* 20:362-387.

Conway D. P. (1964) Variance in effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 25:844-845.

Coop R. L., Kyriazakis I. (2001) Influence of host nutrition on the development and consequences of parasitism in livestock. *Trends Parasitol.* 17:325-330.

Cvilink V., Kubiček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kuběnová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L. (2008) Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 151:242-248.

Cvilink V., Lamka J., Skálová L. (2009) Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug. Metab. Rev.* 41:8-26.

Dayan A. D. (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta. Trop.* 86:141-159.

Di Gennaro P., Bargna A., Sello G. (2011) Microbial enzymes for aromatic compound hydroxylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1817-1827.

Ding Y., Peng M., Zhang T., Tao J. S., Cai Z. Z., Zhang Y. (2013) Quantification of conjugated metabolites of drugs in biological matrices after the hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase and sulfatase: a review of bio-analytical methods. *Biomed. Chromatogr.* 27:1280-1295.

Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B. (1968) Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* 49:2240-2249.

Drudge J. H., Leland S. E., Wyant Z. N. (1957) Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine: II. Studies on pure infections of *Haemonchus contortus*. *Am. J. Vet. Res.* 18:317-325.

Drudge J. H., Szanto J., Wyant Z. N., Elam G. (1964) Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. *Am. J. Vet. Res.* 25:1512-1518.

Ducray P., Gauvry N., Pautrat F., Goebel T., Fruechtel J., Desales Y., Schorderet Weber S., Bouvier J., Wagner T., Froelich O., Kaminsky R. (2008) Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:2935-2938.

Ducháček L. a Lamka J. (2006) *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. 1st ed. Karolinum, Praha, ISBN 80-246-1263-1.

Emery D. L., Wagland B. M. (1991) Vaccines against gastrointestinal nematode parasites of ruminants. *Parasitol. Today* 7:347-349.

Epe C., Kaminsky R. (2013) New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends Parasitol.* 29:129-134.

Fernandes B. C. M., Mateo C., Kiziak C., Chmura A., Wacker J., van Rantwijk F., Stolz A., Sheldon R. A. (2006) Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Adv. Synth. Catal.* 348:2597-2603.

Gibbons L. M. (1979) Revision of the genus *Haemonchus* Cobb, 1898: (Nematoda: Trichostrongylidae). *Syst. Parasitol.* 1:3-24.

Gunn A., Pitt S. J. (2012) *Parasitology: An Integrated Approach*. 1st ed. Willey-Blackwell, New Delhi, ISBN 978-0-470-68424-5.

*Haemonchus contortus* [online]. Poslední revize 01.2008. [cit. 2014-04-28] Dostupné z [http://www.nehu.ac.in/BIC\\_backup09032009/HelMinth\\_Parasite\\_NE/Haemonchus%20contortus.htm](http://www.nehu.ac.in/BIC_backup09032009/HelMinth_Parasite_NE/Haemonchus%20contortus.htm).

Harper D. B. (1977) Microbial metabolism of aromatic nitriles, enzymology of C-N cleavage by *Nocardia* sp. (rhodochrous group) NCIB 11216. *Biochem. J.* 165:309-319.

Hayes J. D., Strange R. C. (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 22:193-207.



Hein W. R., Mackay C. R. (1991) Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 12:30-34.

Hilderson H., de Graaf D. C., Vercruyse J., Berghen P. (1993) Characterisation of *Ostertagia ostertagi* antigens by the different bovine immunoglobulin isotypes. *Res. Vet. Sci.* 55:203-208.

Holčapek M., Kolářová L., Nobilis M. (2008) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* 391:59-78.

Hosking B. C. (2010) A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* 106:529-532.

Hosking B. C., Kaminsky R., Sager H., Rolfe P. F., Seewald W. (2010) A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* 106:529-532.

*How to rid sheep worms without drug dependence* [online]. Poslední revize 04.2014. [cit 2014-04-28]. Dostupné z [http://www.sheepmagazine.com/27-5/john\\_kirchhoff/](http://www.sheepmagazine.com/27-5/john_kirchhoff/).

Iribarne J. V., Thomson B. A. (1976) On the evaporation of charged ions from small droplets. *J. Chem. Phys.* 64:2287–2294.

Jurášek V., Dubinský P. (1993) *Veterinárná parazitológia*. 1st. ed. Příroda, Bratislava, ISBN 80-07-00603-6.

Kaminsky R., Bapst B., Stein P. A., Strehlau G. A., Allan B. A., Hosking B. C., Rolfe P. F., Sager H. (2011) Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* 109:19-23.

Kaminsky R., Ducray P., Jung M., Clover R., Rufener L., Bouvier J., Weber S. S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N., Pautrat F., Skripsky T., Froelich O., Komoin-Oka C., Westlund B., Sluder A., Mäser P. (2008a) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452:176-180.

Kaminsky R., Gauvry N., Schorderet Weber S., Skripsky T., Bouvier J., Wenger A., Schroeder F., Desaulles Y., Hotz R., Goebel T, Hosking B. C., Pautrat F., Wieland-Berghausen S., Ducray P. (2008b) Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol. Res.* 103:931-939.

Kaminsky R., Mosimann D., Sager H., Stein P., Hosking B. (2009) Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep. *Int. J. Parasitol.* 39:443-446.

Kaminsky R., Rufener L. (2012) In: Caffrey C. R. (ed.) *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*. 1st ed Willey-Blackwell, San Francisco, ISBN: 978-3-527-33059-1.

Karadzovska D., Seewald W., Browning A., Smal M., Bouvier J., Giraudel J.M. (2009) Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 32:359-367.

Kaufmann J. (1996) *Parasitic Infections of Domestic Animals: A Diagnostic Manual*. 1st ed. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, ISBN 3-7643-5115-2.

Kealey D., Haines P. J. (2002) *Instant Notes: Analytical Chemistry*. 1st ed., BIOS, Oxford, ISBN 0-203-68109-6.

Kebarle P., Peschke M. (1999) On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal. Chem. Acta* 20070:1-25.

Kinsella B., Byrne P., Cantwell H., McCormack M., Furey A., Danaher M. (2011) Determination of the new anthelmintic monepantel and its sulfone metabolite in milk and muscle using a UHPLC-MS/MS and QuEChERS method. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879:3707-3713.

Klimeš J. (2011) *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1st ed., Nukleus HK, Hradec Králové ISBN 978-80-87009-29-1.

Knox D. P., Redmond D. L., Newlands G. F., Skuce P. J., Pettit D., Smith W. D. (2003) The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates

for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *Int. J. Parasitol.* 33:1129-1137.

Koski K. G., Scott M. E. (2003) Gastrointestinal nematodes, trace elements, and immunity. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 16:237-251.

Lamka J., Ducháček L. (2006) *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 3rd ed. Karolinum, Praha, ISBN 80-246-1243-7.

Lynn R. C. (2009) In: Bowman D. D. (ed.) *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 9th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, ISBN 978-1-4160-4412-3.

Manton V. J. A., Peacock R., Poynter D., Silverman P. H., Terry R. J. (1962) The influence of age on naturally-acquired resistance to *Haemonchus contortus* in young lambs. *Res. Vet. Sci.* 1:308-314.

Marley C. L., Cook R., Barrett J., Keatinge R., Lampkin N. H. McBride S. D. (2003) The effect of dietary forage on the development and survival of helminth parasites in ovine faeces. *Vet. Parasitol.* 118:93-107.

McCrie L., Bairden K., Britton C., Buitkamp J., McKeand J. B., Stear M. J. (1997) Heterogeneity in the recognition of *Ostertagia circumcincta* antigens by serum antibody from mature, infected sheep. *Parasite Immunol.* 19:235-242.

Miller T. A. (1978) Industrial development and field use of the canine hookworm vaccine. *Adv. Parasitol.* 16:333-342.

Miners J. O. a Mackenzie P. I. (1991) Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol. Ther.* 51:347-369.

Mulligan W., Gordon H. McL., Stewart D. F., Wagland B. M. (1961) The use of irradiated larvae as immunising agents in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* infections of sheep. *Aust. J. Agr. Res.* 12:1175-1187.

Newton S. E., Munn E. A. (1999) The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* 15:116-122.

Niessen W. M. A. (2006) *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry* 3rd ed., Taylor & Francis, Boca Raton, ISBN 978-0-8247-4082-5.

Nobilis M., Anzenbacher P., Pastera J., Svoboda Z., Hrubý K., Květina J., Ubik K., Trejtnar F. (1996) Study of the biotransformation of a potential benzocfluorene antineoplastic using highperformance liquid chromatography with high-speed-scanning ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B.* 681:143-151.

Nováková L., Douša M., Blatný P., Jandera P., Planeta J., Maier V., Znaleziņa J. (2013) *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* 1st ed. Europrint, Praha, ISBN 978-80-260-4243-3.

Parkinson A. (2001) In: Klaassen C. D. (ed.) *Casarett & Doull's toxicology – the basic science of poisons.* 7th ed. McGraw-Hill, New York, ISBN 978-0071470513.

Petrovic M., Barceló D. (2006) Application of liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QqTOF-MS) in the environmental analysis. *J. Mass Spectrom.* 41:1259-1267.

Prieto J. G., Justel A., Del Estal J. L., Barrio J. P., Alvarez A. I. (1991) Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 100:397-400.

Radomska-Pandya A., Czernik P. J., Little J. M., Battaglia E., Mackenzie P. I. (1999) Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug. Metab. Rev.* 31:817-899.

Roberts F. H. S., Turned H. N., McKeveř M. (1954) On the specific distinctness of the ovine and bovine “strains” of *Haemonchus contortus* (Rudolphi) Cobb (Nematoda: Trichostrongylidae). *Aust. J. Zool.* 2:275-295.

Roos M. H., Otsen M., Hoekstra R., Veenstra J. G., Lenstra J. A. (2004) Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 34:109-115.

Rowland A., Miners J. O., Mackenzie P. I. (2013) The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45:1121-1132.

Sager H., Hosking B., Bapst B., Stein P., Vanhoff K., Kaminsky R. (2009) Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 159:49-54.

Sedlák E. (2005) *Zoologie bezobratlých*. 2nd ed. Masarykova univerzita, Brno, ISBN 80-210-2892-0.

Schallig H. D. F. H., van Leeuwen M. A. W., Hendrikx W. M. L. (1994). Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 108:351-357.

Skálová L., Boušová I. (eds.) (2011) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 1st. ed. Karolinum, Praha, ISBN 978-80-246-1917-0.

Stear M. J., Bishop, S. C., Henderson, N. G., Scott, I. (2003) A key mechanism of pathogenesis in sheep infected with the nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Anim. Health Res. Rev.* 4:45-52.

Stear M. J., Innocent G. T., Buitkamp J. (2005) The evolution and maintenance of polymorphism in the major histocompatibility complex. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:53-57.

Stear M. J., Doligalska M., Donskowschmelter K. (2007) Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 134:139-151.

Stewart D. F. (1953) Studies on resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus* spp. and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. V. The nature of the selfcure phenomenon. *Aust. J. Agr. Res.* 4:100-117.

Stromberg B. E. (1997) Environmental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.* 72:247-264.

Stuchlíková L., Jirásko R., Vokřál I., Lamka J., Špulák M., Holčápek M., Szotáková B., Bártíková H., Pour M., Skálová L. (2012) Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 405:1705-1712.

Talamini do Amarante A. F. (2011) Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20:263-268.

Taylor M. A., Hunt K. R., Goodyear K. L. (2002) Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* 103:183-194.

Testa B., Krämer S. D. (2010) *The Biochemistry of Drug Metabolism: Conjugations, Consequences of Metabolism, Influencing Factors.* 1st ed. Wiley, Zürich, ISBN 978-3-90639-054-3.

Tukey R. H., Strassburg C. P. (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:581-616.

Utrecht J. P., Trager W. (2007) *Drug Metabolism: Chemical and Enzymatic Aspects.* 2nd ed. Informa Healthcare USA, New York, ISBN 978-1-4200-6103-1.

Ullrich R., Hofrichter M. (2007) Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* 64:271-293.

van Wyk J. A., Gerber H. M., Groeneveld H. T. (1980) A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large-scale application. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 47:147-58.

van Wyk J. A., Malan F. S. (1988) Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet. Rec.* 123:226-228.

van Wyk J. A., Malan F. S., Randles J. L. (1997) How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70:111-122.

Volf P., Horák P. (eds.) (2007) *Paraziti a jejich biologie.* 1st ed. Triton, Praha, ISBN 978-80-7387-008-9.

Waller P. J., Schwan O., Ljungström B. L., Rydzik A., Yeates, G. W. (2004) Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. *Vet. Parasitol.* 126:299-315.

Waller P. J., Thamsborg S. M. (2005). Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends Parasitol.* 20:493-497.

Watson D. L., Gill H. S. (1991). Effect of weaning on antibody responses and nematode parasitism in Merino lambs. *Res. Vet. Sci.* 51:128-132.

Watson J. T., Sparkman O. D. (2007) *Introduction to Mass Spectrometry - Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation.* 4th ed. Wiley, Wiltshire, ISBN 978-0470-51634-8.